

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tina ELERŠEK

**VPLIV MIKROCISTINOV IN PLANKTOPEPTINA  
NA RAST IN FOTOSINTEZO NEKATERIH  
FITOPLANKTONSKIH ORGANIZMOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tina ELERŠEK

**VPLIV MIKROCISTINOV IN PLANKTOPEPTINA  
NA RAST IN FOTOSINTEZO NEKATERIH  
FITOPLANKTONSKIH ORGANIZMOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE INFLUENCE OF MICROCYSTINS AND PLANKTOPEPTIN  
ON GROWTH AND PHOTOSYNTHESIS  
OF SOME PHYTOPLANKTON ORGANISMS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2006

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti. Delo je bilo opravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo - Laboratorij za ekotoksikologijo in na Biotehniški fakulteti v Ljubljani - Oddelek za biologijo - Katedra za biokemijo.

Senat Biotehniške fakultete je za mentorja doktorske disertacije imenoval doc. dr. Bojana Sedmaka in za somentorja prof. dr. Toma Turka.

Komisija za zagovor in oceno:

Predsednica: izr. prof. dr. Alenka GABERŠČIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Bojan SEDMAK  
Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Član: redni prof. dr. Tom TURK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Robert FRANGEŽ  
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Eleršek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 581.1:582.232(043.3)=863
- KG mikrobiologija/ cianobakterije/alge/*Microcystis aeruginosa*/*Scenedesmus quadricauda*/mikrocistini/planktopeptin/anabaenopeptin/klorofil *a*/fikocianini/*in vivo* fluorescenca/cianobakterijski cvet/biodiverziteteta/alelopatija/ekologija mikroorganizmov
- AV ELERŠEK, Tina, univ. dipl. mikr.
- SA SEDMAK, Bojan (mentor); TURK, Tom (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje: biologija
- LI 2006
- IN VPLIV MIKROCISTINOV IN PLANKTOPEPTINA NA RAST IN FOTOSINTEZO NEKATERIH FITOPLANKTONSKIH ORGANIZMOV
- TD Doktorska disertacija
- OP XV, 141 str., 10 pregl. 67 sl., 211 vir.
- IJ SI
- Jl sl/en
- AI Cianobakterije, ki so sposobne cvetenja, proizvajajo velike količine cikličnih peptidov. V vodnem okolju je mnogo različnih fitoplanktonskih organizmov, ki so izpostavljeni tem biološko aktivnim snovem. Izbrali smo predstavnike treh različnih skupin cikličnih peptidov: mikrocinine kot predstavnike hepatotoksičnih cikličnih peptidov, planktopeptin BL1125 kot predstavnika depsipeptidov in anabaenopeptin B kot predstavnika cikličnih peptidov z ureido vezjo. Proučevali smo vpliv teh cikličnih peptidov na morfologijo in fiziologijo nekaterih fitoplanktonskih organizmov. *In vitro* poskusi s cikličnimi peptidi pri nizkih intenzitetah svetlobe (10 in 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) kažejo značilne vplive na različne fitoplanktonske organizme. Inducirajo morfološke in fiziološke spremembe tako pri cianobakterijskih sevih rodu *Microcystis*, kot tudi pri zeleni algi *Scenedesmus quadricauda*. Mikrocinini z vzpodbujanjem združevanja celic in povečevanjem biovolumna cianobakterij vplivajo na hitrejše in boljše nadziranje položaja cianobakterij v vodnem stolpcu, kar tem fitoplanktonskim organizmom omogoča kompeticijsko prednost pred ostalimi. Mikrocinini delujejo na fotosisteme fitoplanktonskih organizmov, kar si lahko razlagamo kot signal, ki napoveduje poslabšanje prihajajočih svetlobnih razmer v cianobakterijskem cvetu. Planktopeptin BL1125 in anabaenopeptin B sta selektivno fitotoksična za fitoplanktonske organizme. Fitotoksičnost planktopeptina BL1125 in anabaenopeptina B se kaže v zmanjšani hitrosti delitve oz. celični lizi in povečani fluorescenci fotosinteznih pigmentov. Odkrivanje delovanja, vloge in pomena cikličnih peptidov je ključnega pomena za razumevanje nekaterih procesov v vodnih telesih, saj te snovi, skupaj z drugimi kemijskimi, fizikalnimi in biološkimi dejavniki, vplivajo na biotsko pestrost.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 581.1:582.232(043.3)=863
- CX microbiology/cyanobacteria/algae/*Microcystis aeruginosa*/*Scenedesmus quadricauda*/microcystins/planktopeptin/anabaenopeptin/chlorophyll *a*/phycocyanins/*in vivo* fluorescence/cyanobacterial bloom/biodiversity/allelopathy/ecology of microorganisms
- AU ELERŠEK, Tina
- AA SEDMAK, Bojan (supervisor); TURK, Tom (co-supervisor)
- PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Graduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, scientific field: biology
- PY 2006
- TI THE INFLUENCE OF MICROCYSTINS AND PLANKTOPEPTIN ON GROWTH AND PHOTOSYNTHESIS OF SOME PHYTOPLANKTON ORGANISMS
- DT Doctoral Dissertation
- NO XV, 141 p., 10 tab. 67 fig., 211 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB Cyanobacteria capable of bloom formation produce cyclic peptides on a large scale. In the aquatic environment many different phytoplankton organisms are exposed to these biologically active substances. The representatives of three different groups of cyclic peptides were chosen: microcystins as the representative of hepatotoxic cyclic peptides, planktopeptin BL1125 as the representative of depsipeptides and anabaenopeptin B as the representative of cyclic peptides possessing ureido lineage. The impact of these cyclic peptides on morphology and physiology of some phytoplankton organisms were studied. *In vitro* experiments with cyclic peptides at low light conditions ( $10$  in  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) demonstrated characteristic influences on different phytoplankton species. Cyclic peptides induce morphological and physiological changes in cyanobacterial strains *Microcystis sp.* as well as in green alga *Scenedesmus quadricauda*. Microcystins induce a faster and better buoyancy regulation in water body as a consequence of cell aggregation and increased biovolume of cyanobacteria. This is a competitive advantage of cyanobacteria in comparison to other phytoplanktonic organisms. Microcystins influence the light harvesting complex of photobionts which can be interpreted as a signal announcing worsening of the light conditions due to the massive proliferation of cyanobacteria. Planktopeptin BL1125 and anabaenopeptin B are selectively toxic for plankton organisms. Phytotoxicity of planktopeptin BL1125 and anabaenopeptin B is exhibited in decreased proliferation or cell lysis and increased fluorescence of photosynthetic pigments. We have discovered that cyclic peptides play more important role than previously believed. Discovery of function, role and importance of cyclic peptides is the key to understanding some of the processes in water environment, because these substances, together with other chemical, physical and biological factors influence biodiversity.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XV
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 FITOPLANKTONSKI ORGANIZMI	3
2.1.1 Fitoplankton	3
2.1.2 Cianobakterije s poudarkom na vrsti <i>Microcystis aeruginosa</i> (Keutz.)	3
2.1.2.1 Dejavniki cvetenja	4
2.1.2.2 Hipoteze o prevladi cianobakterij	6
2.1.3 Zelene alge s poudarkom na vrsti <i>Scenedesmus quadricada</i> (Breb.)	7
2.2 FIZIKALNO - KEMIJSKI DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA FITOPLANKTON	8
2.2.1 Svetloba	8
2.2.1.1 Energijsko ravnovesje	9
2.2.1.2 Vpliv dnevno-nočnih intervalov na rast	9
2.2.1.3 Svetloba kot selektivni dejavnik pri razporeditvi fitoplanktonskih vrst	9
2.2.2 Temperatura	10
2.2.3 Hranila	11
2.2.3.1 Makrohranila in mikrohranila	11
2.2.4 Snovi, vnesene zaradi delovanja človeka	11
2.2.5 Mešanje, tonjenje in lebdenje fitoplanktona	12
2.2.6 Kisik, ogljikov dioksid	13
2.3 BIOLOŠKI DEJAVNIKI IN INTERAKCIJE MED FITOPLANKTONOM	14
2.3.1 Interakcije med fitoplanktonskimi organizmi	15
2.3.1.1 Alelopatija	16
2.3.1.2 Kompeticija	17
2.3.2 Interakcije fitoplanktonskih organizmov, bakterij in bakteriofagov	18
2.3.3 Interakcije fitoplanktonskih organizmov in plenilcev (paša, parazitizem)	19
2.3.4 Simbiotske povezave	19
2.3.5 Interakcije mikroorganizmov – zaznavanje celične gostote	20
2.4 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI CIANOBAKTERIJ	22
2.4.1 Biološko aktivne snovi	22
2.4.2 Mikrocestini	22
2.4.2.1 Struktura	22
2.4.2.2 Sinteza	23
2.4.2.3 Mikrocestini in dejavniki okolja	24
2.4.2.4 Stabilnost, razpad in razgradnja	24
2.4.2.5 Učinki mikrocestinov na evkariontske celice	25
2.4.2.6 Vpliv mikrocestinov na živali in ljudi	26

2.4.2.7	Vpliv mikrocestinov na fitoplanktonske organizme in njihova ekološka vloga	27
<b>2.4.3</b>	<b>Planktopeptini in anabaenopeptini</b>	<b>29</b>
2.4.3.1	Struktura cikličnih depsipeptidov in cikličnih peptidov z ureido vezjo	29
2.4.3.2	Ciklični depsipeptidi	31
2.4.3.3	Ciklični peptidi z ureido vezjo	32
2.5	FOTOSINTEZNI APARAT IN MERITVE FLUORESCENCE	33
<b>2.5.1</b>	<b>Mehanizem fotosinteze</b>	<b>33</b>
2.5.1.1	Vpliv svetlobe in fotoprilagoditev	34
<b>2.5.2</b>	<b>Fotosinteza in fluorescenca klorofila</b>	<b>35</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Fotosintezne značilnosti vrste <i>Scenedesmus quadricauda</i></b>	<b>35</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Fotosintezne značilnosti vrste <i>Microcystis aeruginosa</i></b>	<b>35</b>
2.6	POVZETEK PREGLEDA OBJAV	37
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE DELA</b>	<b>38</b>
3.1	CELIČNE KULTURE FITOPLANKTONA	38
3.2	POSKUSI	40
<b>3.2.1</b>	<b>Umeritvene krivulje</b>	<b>40</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Vpliv gostote kultur na hitrost delitve</b>	<b>40</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Kompeticijski poskusi</b>	<b>40</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Poskusi z različnimi stresnimi dejavniki</b>	<b>40</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Poskusi z mikrocestini (MC)</b>	<b>41</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Poskusi s planktopeptinom BL1125 (PP) in anabaenopeptinom B (AnP B)</b>	<b>41</b>
3.3	MERITVE	43
<b>3.3.1</b>	<b>Število celic</b>	<b>43</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Volumen celic</b>	<b>43</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Vsebnost fotosinteznih pigmentov</b>	<b>44</b>
3.3.3.1	Vsebnost klorofila <i>a</i>	44
3.3.3.2	Vsebnost fikocianinov	44
<b>3.3.4</b>	<b>Fluorescenca fotosinteznih pigmentov</b>	<b>44</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Epifluorescentna mikroskopija</b>	<b>45</b>
<b>3.3.6</b>	<b>Masna spektroskopija</b>	<b>45</b>
3.4	EKSTRAKCIJE IN IZOLACIJE CIKLIČNIH PEPTIDOV	46
<b>3.4.1</b>	<b>Priprava vzorca za analitsko HPLC kolono</b>	<b>46</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Priprava vzorca za preparativno HPLC kolono</b>	<b>46</b>
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	48
<b>3.5.1</b>	<b>Absolutne mere variabilnosti</b>	<b>48</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Linearna regresija</b>	<b>48</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Testiranje hipotez</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>49</b>
4.1	ORGANIZACIJA POGLAVJA REZULTATI	49
4.2	UMERITVENE KRIVULJE	49
4.3	VPLIV GOSTOTE CELIC	49
<b>4.3.1</b>	<b>Vpliv gostote na hitrost delitve</b>	<b>49</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Vpliv gostote na volumen celic</b>	<b>58</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Vpliv gostote na vsebnost in fluorescenca fotosinteznih pigmentov</b>	<b>58</b>
4.4	KOMPETICIJSKI POSKUSI	61
<b>4.4.1</b>	<b>Hitrost delitve</b>	<b>61</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Volumen celic</b>	<b>61</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Vsebnost in fluorescenca fotosinteznih pigmentov</b>	<b>61</b>

<b>4.4.4</b>	<b>HPLC analize</b>	<b>61</b>
4.5	VPLIV STRESNIH DEJAVNIKOV NA IZBRAN FITOPLANKTONSKE ORGANIZME	69
<b>4.5.1</b>	<b>Vpliv stresnih dejavnikov na hitrost delitve</b>	<b>69</b>
4.5.1.1	Indukcija stresa s fizikalnimi dejavniki	69
4.5.1.2	Indukcija stresa s kemijskimi dejavniki	69
4.5.1.3	Indukcija stresa s kombinacijo fizikalnih in kemijskih dejavnikov	69
<b>4.5.2</b>	<b>Vpliv stresnih dejavnikov na fluorescenco pigmentov</b>	<b>72</b>
4.5.2.1	Indukcija stresa s fizikalnimi dejavniki	72
4.5.2.2	Indukcija stresa s kemijskimi dejavniki	72
4.5.2.3	Indukcija stresa s kombinacijo fizikalnih in kemijskih dejavnikov	73
4.6	VPLIV MIKROCISTINOV (MC) NA IZBRANE FITOPLANKTONSKE VRSTE	88
<b>4.6.1</b>	<b>Vpliv MC na združevanje celic</b>	<b>88</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Vpliv MC na volumen celic</b>	<b>90</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Vpliv MC na fluorescenco in vsebnost pigmentov</b>	<b>91</b>
4.7	VPLIV PLANKTOPEPTINA BL1125 (PP) IN ANABAENOPEPTINA B (ANP B) NA IZBRANE FITOPLANKTONSKE VRSTE	100
<b>4.7.1</b>	<b>Masni spektri PP in AnP B</b>	<b>100</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Vpliv PP in AnP B na združevanje celic</b>	<b>101</b>
<b>4.7.3</b>	<b>Vpliv PP in AnP B na hitrost delitve</b>	<b>101</b>
<b>4.7.4</b>	<b>Vpliv PP in AnP B na fluorescenco in vsebnost fotosinteznih pigmentov</b>	<b>105</b>
<b>4.7.5</b>	<b>HPLC analiza supernatantov</b>	<b>109</b>
4.8	PREGLED VPLIVOV CIKLIČNIH PEPTIDOV	110
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>111</b>
5.1	RAZPRAVA	111
<b>5.1.1</b>	<b>Vplivi cikličnih peptidov na fitoplankton</b>	<b>111</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Smernice in potrebe</b>	<b>120</b>
5.1.2.1	Smernice za raziskovanje (EUROHAB, 1998)	121
5.1.2.2	Raziskovalne potrebe (EUROHAB, 1998)	121
5.2	SKLEPI	123
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY)</b>	<b>124</b>
6.1	POVZETEK	124
6.2	SUMMARY	125
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>126</b>



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Ciklični depsipeptidi, ki so jih izolirali iz različnih vrst cianobakterij. _____	31
Preglednica 2: Ciklični peptidi z ureido vezjo, ki so jih izolirali iz različnih vrst cianobakterij. _____	32
Preglednica 3: Seznam sevov cianobakterij in alg, ki smo jih uporabljali pri poskusih. _____	38
Preglednica 4: Medij Jaworsky za gojenje fitoplanktonskih organizmov, pH 7,3 (Thompson, 1988) _____	39
Preglednica 5: Preglednica vsebnosti ( $\mu\text{g}/\text{celico}$ ), določenih z ekstrakcijo, in <i>in vivo</i> fluorescence (fluorescena/celico) klorofila <i>a</i> ter fikocianinov za seva <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma1-NIB in Ma2-NIB pri dveh različnih osvetlitvah. Prikazane so aritmetične sredine. _____	59
Preglednica 6: <i>In vivo</i> fluorescenca ( <i>F</i> ) fotosinteznih pigmentov kulture cianobakterije <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma2-NIB, ki smo jo izpostavili različnim stresnim dejavnikom. V preglednici prikazane številke povedo kolikokrat je <i>F</i> na celico obdelane kulture večja od kontrole šesti dan poskusa. V drugem, tretjem in petem stolpcu so prikazane povprečne vrednosti <i>F</i> , v četrtem pa kvocient <i>F</i> FS II/FS I $\pm$ SD. _____	73
Preglednica 7: Vpliv mikrocistinov MC-LR, MC-RR in MC-YR na biovolumen štirih sevov <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma1-NIB, Ma2-NIB, Ma4-NIB in Ma6-NIB ter zelene alge <i>Scenedesmus quadricauda</i> Sq-NIB. Podatki predstavljajo aritmetično sredino biovolumnov $\pm$ SD in mediano biovolumnov. Celice so rasle pri 20°C, osvetlitvi 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Končna koncentracija MC je bila $5 \times 10^{-7}$ M. _____	90
Preglednica 8: Inhibicija delitve različnih cianobakterijskih sevov, ki proizvajajo mikrocistine in sevov, ki jih ne, inducirane s planktopeptinom BL1125 (PP). Hitrost celične delitve smo določili v eksponentni fazi rasti (šesti dan). Odstotek inhibicije smo izračunali po spodnji formuli: _____	102
Preglednica 9: Primerjava koncentracij planktopeptina BL1125 (PP) v $\mu\text{g}/\text{ml}$ in površine vrhov (p. vrha) biotransformacijskih produktov (BP) v supernatantih kulture <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma2-NIB in <i>Scenedesmus quadricauda</i> Sq-NIB. Površino vrhov smo določili pri 225 nm. Zadrževalni čas BP je 2,7 in 3,1 minute. Zadrževalni čas PP je 3,6 minute. _____	109
Preglednica 10: Povzetek vplivov cikličnih peptidov cianobakterij (mikrocistin-LR, mikrocistin-YR, mikrocistin-RR, [DAsp <sup>3</sup> ]mikrocistin-RR, planktopeptin BL1125 in anabaenopeptin B) na hitrost delitve, inducirano združevanje celic, povečan biovolumen, fluorescenco in vsebnost fotosinteznih pigmentov pri cianobakterijah in zelenih algah. Znak plus označuje vpliv, znak minus označuje, da do vpliva ni prišlo. _____	110

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz pozitivnih, negativnih in kompeticijskih odnosov med fitoplanktonskimi organizmi in drugimi organizmi v vodnem telesu. _____	14
Slika 2: Shematski prikaz razlike med kompeticijo in alelopatijo. _____	15
Slika 3: Struktura najpogostejših mikrocestinov (povzeto po Dawson, 1998). _____	23
Slika 4: Struktura planktopeptinov in anabaopeptinov (Grach-Pogrebinsky <i>in sod.</i> , 2003 ). Zgornja puščica označuje skupino Ahp, ki je značilna za depsi-peptide. Spodnja puščica označuje značilno ureido vez, ki jo najdemo v anabaopeptinih. _____	30
Slika 5: Shema fotosinteznega aparata (povzeto po Voet D in Voet JG., 1995: 640). _____	34
Slika 6: Struktura fikobilisoma, ki ga sestavljajo pigmenti fikoeritrin, fikocianin in alofikocianin. Nekateri fikobilisomi, npr. fikobilisomi cianobakterije <i>Microcystis aeruginosa</i> , ne vsebujejo fikoeritrina. Fikobilisom potuje na citosolni strani tilakoide med fotosistemoma I in II (povzeto po Htt p 1). _____	36
Slika 7: Linearno razmerje med <i>in vivo</i> fluorescenco fikocianinov in številom celic/ml kulture <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma1-NIB, ki smo jo gojili pri osvetlitvi $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Dodana je trendna črta in vrednost $R^2$ . _____	50
Slika 8: Razmerje med <i>in vivo</i> fluorescenco in številom celic/ml kulture <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma1-NIB pri dveh različnih osvetlitvah; (A) fluorescenca fikocianinov (B) fluorescenca klorofila <i>a</i> . Prikazane so aritmetične sredine $\pm$ SD. Izmerjenim vrednostim so dodane vrednosti $R^2$ in trendne črte: polne črte za kulture, ki so rasle pri $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in prekinjene črte za kulture, ki so rasle pri $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . _____	51
Slika 9: Razmerje med <i>in vivo</i> fluorescenco in številom celic/ml kulture <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma2-NIB pri dveh različnih osvetlitvah; (A) fluorescenca fikocianinov (B) fluorescenca klorofila <i>a</i> . Prikazane so aritmetične sredine $\pm$ SD. Izmerjenim vrednostim so dodane vrednosti $R^2$ in trendne črte: polne črte za kulture, ki so rasle pri $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in prekinjene črte za kulture, ki so rasle pri $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . _____	52
Slika 10: Razmerje med vsebnostjo fotosinteznih pigmentov, določeno z ekstrakcijo, in številom celic/ml kulture <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma1-NIB pri dveh različnih osvetlitvah; (A) vsebnost fikocianinov, (B) vsebnost klorofila <i>a</i> . Prikazane so aritmetične sredine $\pm$ SD. Izmerjenim vrednostim so dodane vrednosti $R^2$ in trendne črte: polna črta za kulture ki so rasle pri $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in črtna črta za kulture, ki so rasle pri osvetlitvi $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . _____	53
Slika 11: Razmerje med vsebnostjo fotosinteznih pigmentov, določeno z ekstrakcijo, in številom celic/ml kulture <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma2-NIB pri dveh različnih osvetlitvah; (A) vsebnost fikocianinov (B) vsebnost klorofila <i>a</i> . Prikazane so aritmetične sredine $\pm$ SD. Izmerjenim vrednostim so dodane vrednosti $R^2$ in trendne črte: polne črte za kulture, ki so rasle pri $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in prekinjene črte za kulture, ki so rasle pri osvetlitvi $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . _____	54
Slika 12: Rastne krivulje seva <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma1-NIB pri osvetlitvi (A) $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in (B) $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Trikotniki predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri nizki gostoti celic ( $2 \times 10^4$ celic/ml), krogi predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri srednji gostoti celic ( $2 \times 10^5$ celic/ml) in kvadrati predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri visoki gostoti celic ( $2 \times 10^6$ celic/ml). Puščice označujejo redčenja. _____	55
Slika 13: Rastne krivulje seva <i>Microcystis aeruginosa</i> Ma2-NIB pri osvetlitvi $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Trikotniki predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri nizki gostoti celic ( $2 \times 10^4$ celic/ml), krogi predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri srednji gostoti celic ( $2 \times 10^5$ celic/ml) in kvadrati predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri visoki gostoti celic ( $2 \times 10^6$ celic/ml). Puščice označujejo redčenja. _____	56

Slika 14: Rastne krivulje kulture *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Trikotniki predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri nizki gostoti celic ( $2 \times 10^4$  celic/ml), krogi predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri srednji gostoti celic ( $2 \times 10^5$  celic/ml) in kvadrati predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri visoki gostoti celic ( $2 \times 10^6$  celic/ml). Puščice označujejo redčenja. \_\_\_\_\_ 56

Slika 15: Kulturi *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB in Ma2-NIB pri osvetlitvah 10 in  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; (A) čas v dnevih, ki je potreben, da kulture po tretjem zaporednem redčenju spet dosežejo gostoto  $5 \times 10^6$  celic/ml in (B) povprečni biovolumen, ki ga dosežejo kulture v tem času. Črni stolpci predstavljajo izhodno redko kulturo ( $2 \times 10^4$  celic/ml), sivi stolpci predstavljajo izhodno srednje gosto kulturo ( $2 \times 10^5$  celic/ml) in beli stolpci predstavljajo izhodno gosto kulturo celic ( $2 \times 10^6$  celic/ml). \_\_\_\_\_ 57

Slika 16: Povprečni premeri celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB v  $\mu\text{m}$  pri različnih koncentracijah celic. Abscisna os je prikazana logaritemsko. \_\_\_\_\_ 58

Slika 17: Povprečni premeri celic *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB v  $\mu\text{m}$  pri različnih koncentracijah celic. Abscisna os je prikazana logaritemsko. \_\_\_\_\_ 59

Slika 18: *In vivo* fluorescenca na mililiter kulture *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  pri različnih koncentracijah celic. (A) Fluorescenca klorofila *a* pri  $\lambda_{\text{ex}}$  440 in  $\lambda_{\text{em}}$  680 nm in (B) fluorescenca fikocianinov pri  $\lambda_{\text{ex}}$  620 in,  $\lambda_{\text{em}}$  645 nm. Dodane so trendne črte in vrednost  $R^2$ . \_\_\_\_\_ 60

Slika 19: Logaritmirane rastne krivulje glede na čas pri osvetlitvi (A)  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B)  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Rombi predstavljajo število celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati število Ma2-NIB, trikotniki pa število njune mešanice. Dodane so vrednosti  $R^2$  in trendne črte; modra za Ma1-NIB, zelena za Ma2-NIB in prekinjena rdeča za mešanico. \_\_\_\_\_ 62

Slika 20: Biovolumen ( $\mu\text{m}^3/\text{ml}$ ) monokultur in njihovih mešanic glede na čas: (A) pri osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , (B) pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Rombi predstavljajo biovolumen celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati biovolumen Ma2-NIB, trikotniki pa biovolumen njune mešanice. Dodane so vrednosti  $R^2$  in trendne črte; modra za Ma1-NIB, zelena za Ma2-NIB in prekinjena rdeča za mešanico. \_\_\_\_\_ 63

Slika 21: Biovolumen ( $\mu\text{m}^3/\text{celico}$ ) monokultur *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, Ma2-NIB in njihovih mešanic na začetku in na koncu poskusa: (A) pri osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B) pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . \_\_\_\_\_ 64

Slika 22: Vsebnost klorofila *a*, določena z ekstrakcijo, glede na koncentracijo celic, preračunana: (A) na celico, (B) na volumsko enoto celice. Rombi predstavljajo klorofil celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati klorofil celic *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB, trikotniki pa vsebnost klorofila mešanice pri osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . \_\_\_\_\_ 65

Slika 23: *In vivo* fluorescenca fikocianinov v relativnih enotah na celico glede na koncentracijo celic pri osvetlitvi: (A)  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B)  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Rombi predstavljajo fluorescenco celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati fluorescenco *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB, trikotniki pa fluorescenco njune mešanice. \_\_\_\_\_ 66

Slika 24: *In vivo* fluorescenca fikocianinov v relativnih enotah glede na čas pri osvetlitvi: (A)  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B)  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Rombi predstavljajo fluorescenco celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati fluorescenco *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB, fluorescenco mešanice predstavlja rdeča črta. Črna pikčasta črta predstavlja teoretično izračunano fluorescenco fikocianinov, s predpostavko, da oba seva v mešanici predstavljata 50 % celic. \_\_\_\_\_ 67

Slika 25: Vsebnost mikrocestin v  $\mu\text{g}/\text{celico}$  (stolpci, leva ordinata), določena s pomočjo HPLC iz ekstraktov mešanic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB in Ma2-NIB ter mediane volumnov celic v  $\mu\text{m}^3/\text{celico}$  (črta, desna ordinata) glede na doseženo koncentracijo celic pri osvetlitvi (A)  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B)  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . \_\_\_\_\_ 68

Slika 26: Rastne krivulje kulture *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB, ki smo jih izpostavili ultrazvoku. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki število celic po obdelavi z ultrazvokom (volumen 5 ml, obdelovanje 5 min).

70

Slika 27: Logaritmirane rastne krivulje kulture *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB, ki smo jih izpostavili Tritonu X-100. Krogi predstavljajo kontrolo in kvadrati število celic po dodatku Tritona X-100 v končni koncentraciji 0,01 %.

70

Slika 28: Logaritmirane rastne krivulje kulture *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB, ki smo jih izpostavili inhibitorju fotosinteze - DCMU in dihanja - KCN. Krogi predstavljajo kontrolo, kvadrati rast celic po dodatku DCMU v končni koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  in trikotniki rast celic po dodatku KCN v končni koncentraciji 2 mM.

71

Slika 29: Logaritmirane rastne krivulje kulture *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB, ki smo jih izpostavili zamrzovanju in dodatku DCMU. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki rast celic po zamrzovanju, kvadrati rast celic po dodatku DCMU v končni koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  in črni krogi rast celic po obdelavi z zamrzovanjem in dodatku DCMU v končni koncentraciji 10  $\mu\text{M}$ .

71

Slika 30: Vpliv ultrazvoka na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki pa vpliv ultrazvoka glede na čas. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence.

74

Slika 31: Vpliv ultrazvoka na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki pa vpliv ultrazvoka glede na čas. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence.

75

Slika 32: Vpliv Tritona X-100 na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo in kvadrati vpliv 0,01 % Tritona X-100 glede na čas.

76

Slika 33: Vpliv Tritona X-100 na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo in kvadrati vpliv Tritona X-100 v končni koncentraciji 0,01 % glede na čas.

77

Slika 34: Vpliv KCN na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I seva *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, sivi trikotniki vpliv KCN v končni koncentraciji 1  $\mu\text{M}$ , rombi KCN v končni koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  in črni trikotniki, povezani s prekinjeno črto, KCN v končni koncentraciji 2 mM.

78

Slika 35: Vpliv KCN na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico seva *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, sivi trikotniki vpliv KCN v končni koncentraciji 1  $\mu\text{M}$ , rombi KCN v končni koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  in črni trikotniki, povezani s prekinjeno črto, KCN v končni koncentraciji 2 mM.

79

Slika 36: Vpliv DCMU in KCN na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, kvadrati vpliv DCMU v končni koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  in trikotniki vpliv KCN v končni koncentraciji 2 mM.

80

Slika 37: Vpliv DCMU in KCN na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, kvadrati vpliv DCMU v končni koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  in trikotniki vpliv KCN v končni koncentraciji 2 mM glede na čas.

81

Slika 38: Vpliv bacitracina na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I seva *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Beli stolpci predstavljajo kontrolo, sivi stolpci vpliv štirih enot in črni stolpci vpliv dvajsetih enot bacitracina.

82

Slika 39: Vpliv bacitracina na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Beli stolpci predstavljajo kontrolo, sivi stolpci vpliv štirih enot in črni stolpci vpliv dvajsetih enot bacitracina. \_\_\_\_\_ 83

Slika 40: Vpliv KCN v končni koncentraciji 25  $\mu\text{M}$  in planktopeptina BL1125 (PP) v končni koncentraciji  $10^{-7}$  M na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I seva *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, sivi trikotniki vpliv KCN, črni rombi, povezani s prekinjeno črto, predstavljajo kombinacijo vpliva KCN in PP in zvezdice vpliv PP. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence. \_\_\_\_\_ 84

Slika 41: Vpliv KCN v končni koncentraciji 25  $\mu\text{M}$  in planktopeptina BL1125 (PP) v končni koncentraciji  $10^{-7}$  M na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, sivi trikotniki vpliv KCN, črni rombi, povezani s prekinjeno črto, predstavljajo kombinacijo vpliva KCN in PP in zvezdice vpliv PP. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence. \_ 85

Slika 42: Vpliv zmrzovanja in DCMU na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I seva *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki vpliv zmrzovanja, kvadrati vpliv DCMU v koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  in črni krogi, povezani s prekinjeno črto, kombinacijo zmrzovanja in DCMU. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence. \_\_\_\_\_ 86

Slika 43: Vpliv zmrzovanja in DCMU na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico seva *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki vpliv zmrzovanja, kvadrati vpliv DCMU v koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  in črni krogi, povezani s prekinjeno črto, kombinacijo zmrzovanja in DCMU. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence. \_\_\_\_\_ 87

Slika 44: Vpliv mikrocinov [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR na porazdelitev in fluorescenco celic *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB osmi dan poskusa, povečava 200  $\times$ . A in B sta svetlobni fotografiji posneti s faznim kontrastom, C in D z epifluorescentnim mikroskopom z uporabo filtra B2A. Cianobakterije so rasle pri temperaturi 20°C in osvetlitvi 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Kontrolne celice so razporejene v homogeni plasti (A in C). Celice, izpostavljene  $5 \times 10^{-7}$  M [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR, niso v isti ravnini, marveč se združujejo v nepravilne gručice, ki močnejše fluorescirajo (B in D). \_\_\_\_\_ 88

Slika 45: Vpliv mikrocinov [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR na porazdelitev in fluorescenco celic *Microcystis aeruginosa* Ma4-NIB šesti dan poskusa, povečava 200  $\times$ , epifluorescentna mikroskopija z uporabo filtra B2A. Cianobakterije so rasle pri temperaturi 20°C in osvetlitvi 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . (A) Kontrolne celice so razporejene v homogeni plasti na dnu rastne kamrice. (B) Celice, izpostavljene  $5 \times 10^{-7}$  M [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR, niso v isti ravnini, marveč se združujejo v nepravilne skupke, ki močnejše fluorescirajo. \_\_\_\_\_ 89

Slika 46: Vpliv mikrocinov MC-LR na porazdelitev cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB šesti dan poskusa, povečava 600  $\times$  in 100  $\times$  (desno zgoraj). Alge so rasle pri temperaturi 20°C in osvetlitvi 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . (A) Kontrolni cenobiji so razporejeni v homogeni plasti na dnu rastne kamrice. (B) Cenobiji, izpostavljeni  $5 \times 10^{-7}$  M MC-LR, niso v isti ravnini, temveč se združujejo v nepravilne skupke. \_\_\_\_\_ 89

Slika 47: Vpliv mikrocinov [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M na porazdelitev in fluorescenco cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB osmi dan poskusa, povečava 200  $\times$ , epifluorescentna mikroskopija z uporabo filtra B2A. Alge so rasle pri temperaturi 20°C in osvetlitvi 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . (A) Kontrolni cenobiji so razporejeni dokaj enakomerno. (B) Cenobiji, izpostavljeni MC, se združujejo v nepravilne skupke, ki močnejše fluorescirajo. \_\_\_\_\_ 89

Slika 48: Povečanje biovolumna zaradi dodatka [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M pri vrsti *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo in kvadrati celice, ki smo jim dodali MC. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 90

Slika 49: Spremembe biovolumna celic *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB; kontrolne celice (levo) in celice, ki smo jim dodali mikrocin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v končni koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M (desno). \_\_\_\_\_ 91

Slika 50: Avtofluorescenca cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB šesti dan po dodatku mikrocinov [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M. Epifluorescentni mikroskop z uporabo filtra B2A pri povečavi  $600 \times$  (A in B) in  $1000 \times$  (C in D). Kontrolni cenobiji (A in C), cenobiji, ki smo jih obdelali z [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR (B in D). \_\_\_\_\_ 92

Slika 51: Vpliv mikrocinov [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR na razporeditev klorofila *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB osmi dan poskusa, povečava  $600 \times$ , fazni kontrast. Zelene alge so rasle pri temperaturi  $20^\circ\text{C}$  in osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . (A) Kontrolne celice imajo homogeno razporejen klorofil. (B) Celice, izpostavljene  $5 \times 10^{-7}$  M MC-RR, imajo nepravilno razporejen klorofil, vidna so tudi področja brez klorofila. \_\_\_\_\_ 93

Slika 52: Razmerje *in vivo* fluorescence na mililiter kulture ( $\lambda_{\text{ex}}$  440;  $\lambda_{\text{em}}$  680/730nm - FS II/FS I) klorofila *a* zelene alge *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB glede na čas. Mikrocin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M zmanjša razmerje fluorescence od drugega dne dalje. \_\_\_\_\_ 93

Slika 53: *In vivo* fluorescence klorofila *a* v relativnih enotah na celico *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB pri (A)  $\lambda_{\text{ex}}$  440 in  $\lambda_{\text{em}}$  730 nm in (B)  $\lambda_{\text{ex}}$  480 in  $\lambda_{\text{em}}$  720 nm; oboje predstavlja fluorescenco fotosistema I (FS I). Mikrocin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenco klorofila *a*/celico od četrtega dne dalje. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 94

Slika 54: *In vivo* fluorescence klorofila *a* v relativnih enotah na celico *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB glede na čas pri: (A)  $\lambda_{\text{em}}$  680 nm, kar predstavlja fluorescenco fotosistema II in (B)  $\lambda_{\text{em}}$  730 nm, kar predstavlja fluorescenco fotosistema I. Mikrocin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenco klorofila *a*/celico šesti in osmi dan poskusa v obeh fotosistemih. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 95

Slika 55: *In vivo* fluorescence fikocianinov v relativnih enotah na celico *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB glede na čas pri  $\lambda_{\text{ex}}$  620 in  $\lambda_{\text{em}}$  645 nm. Mikrocin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenco fikocianinov/celico šesti in osmi dan poskusa. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 96

Slika 56: *In vivo* fluorescence klorofila *a* v relativnih enotah na celico *Microcystis aeruginosa* Ma4-NIB glede na čas: (A) fotosistem II in (B) fotosistem I. Mikrocin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenco klorofila *a*/celico šesti in osmi dan poskusa v obeh fotosistemih. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 97

Slika 57: *In vivo* fluorescence fikocianinov v relativnih enotah na celico *Microcystis aeruginosa* Ma4-NIB glede na čas. Mikrocin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenco fikocianinov/celico šesti in osmi dan poskusa. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 98

Slika 58: Vpliv mikrocinov MC-LR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M na povišanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov, določenih z ekstrakcijo: (A) klorofil *a* v celicah *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB in (B) fikocianini v celicah *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Fitoplanktonske kulture so rasle pri temperaturi  $20^\circ\text{C}$  in osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 99

Slika 59: Masni spekter: (A) planktopeptin BL1125 (PP) in (B) anabaenopeptin B (AnP B). \_\_\_\_\_ 100

Slika 60: Vpliv planktopeptina BL1125 (PP) na porazdelitev (A in B) celice *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB šesti dan poskusa in (C in D) cenobiji *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB osmi dan poskusa, povečava  $200 \times$ , fazni kontrast. Fitoplanktonski organizmi so rasli pri temperaturi  $20^\circ\text{C}$  in osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . (A) Kontrolne celice so razporejene enakomerno. (B) Ni vpliva na združevanje pri dodatku  $10^{-7}$  M PP. (C) Kontrolni cenobiji so razporejeni dokaj enakomerno. (D) Cenobiji, obdelani z  $10^{-7}$  M PP, niso v isti ravnini, marveč se združujejo v nepravilne gručice. Odstotek poškodovanih cenobijev se med kontrolnimi in obdelanimi celicami ne razlikuje bistveno. \_\_\_\_\_ 101

Slika 61: Rastne krivulje (aritmetična sredina  $\pm$  SD): (A) sev *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. (B) sev *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB in (C) alga *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB. Kontrole (krogi) in celice,

obdelane s planktopeptinom BL1125 (PP) pri koncentracijah  $10^{-6}$  M (trikotniki),  $10^{-7}$  M (kvadrati) in  $10^{-8}$  M (rombi). Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 103

Slika 62: Rastne krivulje (aritmetična sredina  $\pm$  SD): (A) sev *Microcystis aeruginosa* Ma4-NIB in (B) alga *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB. Kontrole (krogi) in celice, obdelane s anabaenopeptinom B (AnP B) pri koncentracijah  $10^{-6}$  M (rombi) in  $10^{-7}$  M (kvadrati). Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 104

Slika 63: Vpliv planktopeptina BL1125 v koncentraciji  $10^{-7}$  M na avtofluorescenca in združevanje cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB pri povečavi 200x: (A) kontrolni cenobiji, (B) cenobiji, obdelani s PP, osmi dan poskusa. \_\_\_\_\_ 105

Slika 64: *In vivo* fluorescenca fikocianinov ( $\lambda_{ex}$  620,  $\lambda_{em}$  645 nm) v relativnih enotah na celico (aritmetična sredina  $\pm$  SD): (A) sev *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB in (B) Ma1-NIB. Prikazana je fluorescenca preračunana na celico in fluorescenca na ml (insert v zgornjem delu vsake slike). Kontrolne celice (krogi) in celice, obdelane z  $10^{-6}$  M planktopeptinom BL1125 (PP) (kvadrati). Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 106

Slika 65: *In vivo* fluorescenca klorofila v relativnih enotah na celico (aritmetična sredina  $\pm$  SD): (A) sev *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB ( $\lambda_{ex}$  440,  $\lambda_{em}$  680 nm – FS II), (B) sev Ma1-NIB ( $\lambda_{ex}$  440,  $\lambda_{em}$  680 nm – FS II), (C) alga *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB ( $\lambda_{ex}$  440,  $\lambda_{em}$  730 nm – FS I). Kontrolne celice (krogi) in celice, obdelane z  $10^{-7}$  M planktopeptinom BL1125 (PP) (kvadrati). Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 108

Slika 66: Povečanje vsebnosti klorofila *a* na celico *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB zaradi dodatka planktopeptina BL1125 (PP) v končni koncentraciji  $10^{-7}$  M. Vsebnosti smo določili z ekstrakcijo. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike. \_\_\_\_\_ 108

Slika 67: Avtofluorescenca cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB, ki smo jih po dodatku planktopeptina BL1125 v koncentraciji  $10^{-7}$  M gojili tri dni v temi. Intakten klorofil fluorescira rdeče, celice, ki odmirajo, so zelene. Ni razlik v fluorescenci in razporeditvi klorofila med (A) kontrolnimi cenobiji in (B) cenobiji, ki smo jim dodali PP. \_\_\_\_\_ 109

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Adda	3-amino-9-metoksi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienojska kislina
AI	avtoinducer, avtoinduktorska molekula
AnP	anabaenopeptin
DCMU	3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea, komercialno ime: diuron
ekspresija	izražanje genov
<i>F</i>	fluorescenca fotosinteznih pigmentov
FS I	fotosistem I
FS II	fotosistem II
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti ( <i>ang. high performance liquid chromatography</i> )
inducirati	povzročiti, vzbujati, sprožiti
inhibirati	zaustaviti, zavreti
<i>I<sub>s</sub></i>	intenziteta oz. jakost svetlobe
MC	mikrocistin, mikrocistini
mol fotonov	enota za intenziteto oz. jakost svetlobe ( <i>I<sub>s</sub></i> ), ponavadi mikro-moli na kvadratni meter na sekundo ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
PP	planktopeptin BL1125
proliferacija	delitev, razmnoževanje
QS	zaznavanje celične gostote ( <i>ang. quorum sensing</i> )
$R^2$	regresijski koeficient
RuBisCo	ribuloza-1,5-bifosfat-karboksilaza-oksigenaza
SD	standardna deviacija



## 1 UVOD

Vsako vodno telo je svet zase. V takšnem svetu živijo številni različni organizmi in veljajo številni zakoni narave. Razumeti vse vzroke in posledice dogajanj, ki se odvijajo v nekem vodnem telesu, je zaradi zapletenosti takega sistema skoraj nemogoče. Kljub temu je vsak korak k razumevanju vsaj enega dela dogajanj korak naprej.

Fitoplankton sestavljajo fototrofni organizmi različnih taksonomskih skupin, večinoma so to alge in cianobakterije. Čeprav so cianobakterije glede na prokariotsko celično zgradbo sestavni del bakterioplanktonske združbe v vodnem telesu, jih v našem delu, zaradi njihove sposobnosti fotosinteze in zaradi lažje predstavitve problematike, obravnavamo skupaj z algami kot fitoplankton. Vsaka fitoplanktonska združba si prizadeva ostati v primernih svetlobnih razmerah dovolj dolgo, da uspešno zaključi rast in razmnoževanje. Poleg osnovnih fizioloških zahtev glede svetlobe in temperature so zelo pomembna tudi hranila ter mnogi drugi fizikalni in kemijski dejavniki. Za razvoj fitoplanktonske populacije so prav tako pomembne biološke povezave med organizmi, tako v populaciji sami kot tudi povezave med organizmi različnih populacij. Biološke povezave in komunikacije lahko potekajo na različne načine, bodisi z neposredno povezavo celic oz. kolonij ali s pomočjo različnih snovi, ki jih organizmi izločajo v okolje.

Cvetenje cianobakterij v povezavi z eutrofikacijo površinskih voda je v zadnjih desetletjih vedno bolj pogost pojav po vsem svetu (Harper, 1992; Kotak *in sod.*, 1993; Bowling, 1994; Lee *in sod.*, 1998; Vasconcelos, 1999) in tako tudi pri nas (Sedmak in Kosi, 1997 a in b; 2002). Eutrofikacija je proces povečevanja količine hranilnih snovi, zlasti fosforja in dušika, kar povzroči bujno rast rastlin in mikroorganizmov, še posebej fotosinteznih. Pogosta je predvsem v obremenjenih rekah in jezerih in je v večini primerov vezana na človeške aktivnosti (Reynolds, 1984). Vsako razbohotenje (cvetenje) ene same vrste izrine mnoge druge in tako zmanjšuje biološko pestrost organizmov. Kopičenje velikega števila cianobakterij na površini in v vodnem stolpcu med drugim ovira tudi prodiranje svetlobe v globino. Cianobakterije z intenzivnim razvojem odvzamejo hranilne snovi drugim planktonskim vrstam. Vse to vodi v siromašenje ekosistema ne glede na količino organske mase v vodi. Ko populacija cianobakterij doseže svoj vrhunec, začne odmirati. Pri tem se poveča število heterotrofnih bakterij. Ogromne količine odmrle organske mase za lastno razgradnjo odvzamejo v vodi raztopljeni kisik. Pri razkrajanju cianobakterijskega cveta se v vodo sproščajo precejšnje količine snovi, ki so biološko aktivne. Osredotočili se bomo predvsem na ciklične peptide. Občutljivejše živalske in rastlinske vrste ne preživijo takih fizikalno-kemijskih sprememb okolja, kar povzroča siromašenje biotopa po cvetenju cianobakterij (Sedmak in Kosi, 1998).

Naš namen je bil raziskati, kako biološko aktivne snovi, ki jih proizvajajo cianobakterije v vodnih telesih, vplivajo na predstavnike fitoplanktona. Zanimalo nas je, kakšen je vpliv izbranih biološko aktivnih snovi, kot so mikrocinini (najbolje raziskani ciklični peptidi cianobakterij), planktopeptini (predstavniki depsi-peptidov) in anabaenopeptini (predstavniki cikličnih peptidov z ureido vezjo), na delitev, rast in fotosintezo nekaterih fitoplanktonskih organizmov. Predpostavili smo, da četudi je posamezen vpliv izbrane biološke aktivne snovi relativno majhen, lahko vsota vseh dejavnikov močno vpliva na dogajanje v evtrofnih vodnih telesih, kjer prevladujejo cianobakterije. Z opazovanji v naravi in laboratorijskimi poskusi smo poskusili razložiti vlogo različnih cikličnih peptidov cianobakterij ob nastanku cianobakterijskih cvetov. S pomočjo spoznavanja učinkov cikličnih peptidov na fiziologijo in morfologijo fitoplanktonskih organizmov smo skušali razložiti kakšen vpliv imajo različni sevi cianobakterij oz. njihovi produkti, na razvoj cveta in zakaj je večina cvetov na svojem vrhuncu toksična.

Postavili smo dve osnovni hipotezi:

1. Ciklični peptidi cianobakterij vplivajo na fitoplanktonske organizme in s tem na razvoj cianobakterijskega cveta.
2. Delovanje cikličnih peptidov cianobakterij se odraža na fotositeznem aparatu fototrofov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 FITOPLANKTONSKI ORGANIZMI

#### 2.1.1 Fitoplankton

Navkljub različnim fiziološkim potrebam in različni toleranci do fizikalnih in kemijskih dejavnikov v okolju, fitoplankton sestavlja mnogo različnih združb in populacij. Gibanje fitoplanktona ni aktivno, saj je v največji meri odvisno od gibanja vodnih mas. Nekateri fitoplanktonski organizmi uravnavajo gibanje s pomočjo bičkov in/ali različnih mehanizmov uravnavanja vzgona. Gostota fitoplanktonskih organizmov je le malce večja od gostote vode, zato organizmi, ki nimajo posebnih prilagoditev, v vodnem okolju brez tokov počasi tonejo.

Fitoplanktonski organizmi so pomembni primarni producenti in sodelujejo pri samočistilnih procesih v vodnih ekosistemih, prisotnost ali odsotnost določenih vrst pa kaže na prizadetost ekosistemov. Ker so to večinoma kozmopolitski organizmi, težko govorimo o ogroženosti posameznih vrst, lahko pa govorimo o ogroženosti ekosistemov. Iz do sedaj zbranih podatkov ocenjujejo (Vrhovšek in Kosi, 1983), da je na ozemlju Slovenije prisotnih okoli 2000 vrst alg. Z uničevanjem ali obremenjevanjem vodnih ekosistemov se spreminja kakovostna in količinska zastopanost vrst. V večini primerov prihaja do osiromašenja vrst in do kvantitativnega povečanja tistih, ki so bolj prilagojene na določene spremembe v okolju. Kadar so te spremembe nastale zaradi regulacije rek ali z gradnjo akumulacijskih jezer in spremembami vodotokov, lahko s ponovno oživitvijo in zmanjšanjem obremenjevanja zopet dokaj hitro vzpostavimo porušeno pestrost. V primerih, ko gre za trajno spremembo ekosistema, npr. izsuševanje močvirij, visokih barij in podobno, so vrste na teh območjih izgubljene (Kosi, 1999).

#### 2.1.2 Cianobakterije s poudarkom na vrsti *Microcystis aeruginosa* (Keutz.)

V morjih so običajna cvetenja dinoflagelatov, enoceličnih ali kolonijskih morskih alg. V celinskih vodah najdemo druge organizme, ki so sposobni cvetenja, cianobakterije. Določene vrste predstavnikov obeh skupin so potencialno toksične. Presenetljivo je, da ti dve popolnoma različni skupini organizmov, ki množično naseljujeta vodno okolje, lahko vsebujeta ne samo podobne, temveč tudi strukturno identične toksine (Sedmak, 1994).

Cianobakterije so zaradi svoje raznolike in enkratne fiziologije ter različnih prilagoditev izjemno oportunistična skupina fitoplanktona celinskih voda. Cianobakterije so vplivale na spremembo biosfere iz anoksične v oksično. Mnogi vodni ekosistemi so ekstremni, posebej kar zadeva fizikalno-kemijske razmere in posledično biotske razmere. Take ekstremne razmere lahko fiziološko in ekološko prilagodljive cianobakterije zlahka izkoristijo sebi v prid (Pearl, 1988).

Poleg klorofila *a*, ki je značilen za vse avtotrofne organizme, imajo cianobakterije še pomožna fotosintezna barvila kot sta fikocianin in fikoeritrin. Kadar prevladuje fikoeritrin, so organizmi obarvani rdeče, rjavkasto oz. črno, sicer so obarvani modro-zeleno. S temi barvili so cianobakterije sposobne kromatične prilagoditve. Tvorbo teh barvil lahko uravnavajo tako, da kar najbolj izkoristijo razpoložljivo svetlobo (Raps *in sod.*, 1983).

Zaradi zmožnosti vezave atmosferskega dušika so cianobakterije pogosto prebivalci voda, kjer dušika sicer primanjkuje. Mnogokrat so prevladujoče v primerjavi z drugimi fitoplanktonskimi organizmi, ki te zmožnosti nimajo. V času ugodnih razmer znotraj celic kopičijo fosfor in ga porabljajo, ko ga v vodi primanjkuje. Asimilirani ortofosfat se encimsko polimerizira v polifosfat, ki je v obliki polifosfatnih telesc znotraj celic. Iskanje ugodnega okolja glede na koncentracije fosforja v dnevno-nočnem ciklu poteka pri cianobakterijah s spreminjanjem sposobnosti lebdenja, ki ga uravnavajo z nastankom znotrajceličnih plinskih vakuol in nalaganjem stranskih produktov metabolizma, kar je povezano s fotosintezno aktivnostjo (Walsby, 1994). Aktivno uravnavanje lebdenja jim omogoča najti optimalne razmere za razvoj tako glede hranil, kakor tudi svetlobe temperature (Pearl, 1988). Tudi kinetika privzemanja ogljikovega dioksida daje cianobakterijam v primerjavi z drugimi fitoplanktonskimi organizmi veliko prednost (Lucas *in sod.*, 1985; Shapiro, 1990).

Cianobakterije so v fitoplanktonski združbi celinskih voda zelo uspešna in mnogokrat prevladujoča skupina. Na splošno velja, da planktonske cianobakterije v zmernem podnebnem pasu v poletnem obdobju prevladujejo. V evtrofnih in hipertrofnih vodnih telesih so cvetenja najbolj izrazita (Reynolds, 1984). Cvetenje cianobakterij je naravni pojav, spontan ali izzvan z neodgovornim ravnanjem človeka. V Sloveniji imamo relativno veliko število površinskih voda, različnih velikosti in izvora. Toksične cianobakterije cvetijo predvsem v severovzhodni Sloveniji, kjer so površinske vode močno evtrofne (Sedmak in Kosi, 1997 a in b, 1998; Kosi, 1999). Masovno pojavljanje cianobakterij je v večini primerov vezano na poletna in jesenska obdobja, ko pride do poletne razslojenosti vode z najvišjimi temperaturami na površini. Vrsta *M. aeruginosa* se v ugodnih razmerah pogosto prekomerno namnoži in lahko najprej v tanki (t.i. površinski cvet), kasneje pa v debelejši plasti (do 10 cm) prekrije vodno površino in tako nastane površinska gošča (*ang. scum*) (Carmichael in Falconer, 1993). Opazili so tudi, da v vodnih telesih, kjer so prisotni makrofiti, praviloma ne prihaja do tako bujnega cvetenja cianobakterij (Sedmak, 1994).

Vrsta *M. aeruginosa* spada med cianobakterije (*Cyanophyceae*) in jo prištevamo med fitoplanktonske vrste. Zgradba celice je prokariotska. Celice so okrogle, velike 3 - 7  $\mu\text{m}$ . Združene so v kolonije oz. agregate, ki so nepravilne oblike in obdane z galerto. V mladosti so kolonije kroglaste ali podolgovate, starejše pa so mrežasto preluknjane ali pretrgane. Vrsta *M. aeruginosa* ne vsebuje fotosinteznega barvila fikoeritrina. Sevi vrste *M. aeruginosa* lahko vsebujejo toksine, ki se ob odmiranju celic sproščajo v vodo in predstavljajo potencialno nevarnost za organizme v jezeru in ob njem (Carmichael in Falconer, 1993). Tudi v Sloveniji so v površinskih vodah pogosti cianobakterijski cvetovi, kjer prevladuje vrsta *M. aeruginosa* in običajno so ta cvetenja toksična (Sedmak in Kosi, 1997 a; Kosi, 1999).

#### 2.1.2.1 Dejavniki cvetenja

Na razvoj neke fitoplanktonske populacije vplivajo številni fizikalno-kemijski dejavniki: svetloba, temperatura, hranilne snovi, vsebnost kisika, pH, razlike v dolžini dneva in noči, temperatura, mešanje vode in padavine. Dejavniki, kot so razlike v dolžini dneva, temperatura, mešanje zaradi vetra, padavine in izpiranje ter dotok hranil vplivajo bolj izrazito na manjša vodna telesa (Sedmak in Kosi, 1998). Razmere v okolju niso vedno optimalne za vse fitoplanktonske vrste, zato se različne vrste pojavljajo in prevladujejo v

različnih obdobjih leta in na različnih globinah (Reynolds, 1984). Vsi dejavniki, ki vplivajo na razvoj fitoplanktonskih populacij, vplivajo tudi na njihovo masovno pojavljanje ali cvetenje.

Količina svetlobe se z globino manjša, na kar vpliva število planktonskih organizmov in drugih razpršenih delcev v zgornjih plasteh vode. Na vodni gladini je koncentracija fitoplanktona majhna, saj je svetloba za večino vrst, posebej poleti, premočna. Le redke vrste, odporne proti poškodbam, ki jih povzročajo žarki UV in močna osvetljenost, se zadržujejo na površini (Mur in Schreurs, 1995).

Fitoplankton s svojo aktivnostjo lahko spreminja tudi pH vode. Pri fotosintezi izrablja v vodi raztopljeni CO<sub>2</sub> in s tem zvišuje vrednost pH, pri dihanju ga izloča in pH znižuje. Kislost oziroma bazičnost vode je odvisna predvsem od matične kamnine, puferske sposobnosti vode in drugih dejavnikov (Shapiro, 1990). Podobno je s količino v vodi raztopljenega kisika. Pri fotosintezi se kisik sprošča, pri dihanju pa porablja. Fitoplankton podnevi zaradi povečane fotosinteze proizvaja veliko kisika, ponoči pa ga porablja (Reynolds, 1984).

Količina hranil med poletno razslojenostjo vodnega telesa z globino narašča. V zgornjih plasteh primanjkuje fosforjevih in dušikovih spojin, zato je v teh plasteh rast fitoplanktonskih vrst omejena predvsem s količino razpoložljivih hranil. V globljih plasteh je hranil dovolj, vendar ni svetlobe za učinkovito fotosintezo (Reynolds, 1984).

V celinskih vodah, ki so bogate s hranili, pogosto pride do masovnega razvoja cianobakterij. Katero vrsto cianobakterij bomo našli, je odvisno od lastnosti vodnega telesa in ekoloških dejavnikov. Za razvoj cianobakterijskega cveta je pomembna tako dnevno/nočna razslojenost kot sezonska, ki je pomembna predvsem v klimatih z letnimi časi (Reynolds, 1984). Mur (1998) poroča, da v nerazslojenih plitkih jezerih velikokrat prevladuje rod *Planktothrix* (*Oscillatoria*), v razslojenih jezerih pa se cianobakterije navadno s pomočjo plinskih vakuol zadržujejo le na točno določeni globini. Najpogostejši rodovi so: *Microcystis*, *Planktothrix* in *Anabaena*. Ugotovil je, da sta v jezerih z dalj časa trajajočim pomanjkanjem dušika, zelo pogosta rodova *Anabaena* in *Aphanizomenon*. V slovenskih vodnih telesih z visoko vsebnostjo hranil sta v toksičnih cvetovih v letih 1994 in 1995 prevladovali vrsti *M. aeruginosa* in *M. wesenbergii*. Najbolj pogost MC je bil MC-RR. Po našem mnenju so za podobnost v proizvodnji določenih MC v veliki meri odgovorni okoljski dejavniki in ne fizični prenos toksičnih sevov (Sedmak in Kosi, 1997 a in b). Prednost, ki jo nudi sposobnost tvorbe strupenih snovi, zaenkrat ostaja še nepojasnen paradoks. Vprašanja, kot so, kaj vse je potrebno, da cianobakterije prevladajo in kako se vzdržujejo velike populacije v cvetu, ostajajo še nerazrešena. Obstaja kar nekaj raziskav o dejavnikih, ki naj bi vplivali na sposobnost prevladovanja v določenih tipih jezer. Opaziti je tendenco, da skupine cvetočih vrst, ki imajo posebne lastnosti, spadajo v določene asociacije (Reynolds, 1997).

### 2.1.2.2 Hipoteze o prevladi cianobakterij

Večina hipotez razlaga razrast in prevlado cianobakterij v določenem obdobju leta in velja v glavnem za določene rodove. Obstaja več različnih hipotez, ki razlagajo prevlado cianobakterij. V naravi gre verjetno za kombinacijo večih.

Hipoteza, ki upošteva izrabo svetlobe, pravi, da so cianobakterije v primerjavi z ostalimi fitoplanktoni sposobne bolj učinkovite izrabe svetlobe nizkih intenzitet s pomočjo pomožnih fikobilisomskih pigmentov, medtem ko se s karotenoidnimi pigmenti zaščitijo tudi pred premočno svetlobo (Pearl, 1996; Utkilen in Gjolme, 1992).

Hipoteza, ki upošteva spreminjanje plovnosti celic, zagovarja, da cianobakterije z uravnavanjem plovnosti lahko dosežejo kar najboljši možen kompromis med primerno svetlobo in zadostno količino hranil in mikro-hranil. Nekatere cianobakterije nadzorujejo svoj položaj v vodnem stolpcu s pomočjo plinskih vakuol in sintezo balastnih snovi. Združevanje v kolonije omogoča bolj učinkovito izkoriščanje svetlobe in štiti pred izsušitvijo (Bucka, 1989; Utkilen in Gjolme, 1992).

Hipoteza, ki upošteva povišano temperaturo vode, pravi, da potrebujejo za optimalno delitev in rast cianobakterije višjo temperaturo (nad 20 °C) kot ostali fitoplanktonski organizmi (Bucka, 1989), kar je nedvomno ena od prednosti v takšnih razmerah.

Tudi hipoteza, osnovana na razmerju poglavitnih hranil (t.i. N : P hipoteza), temelji na izjemni lastnosti cianobakterij, da se lahko delijo in rastejo pri zelo nizkem razmerju dušika in fosforja. Ob pomanjkanju hranil uporabijo rezervne snovi. Pomembno je tudi, da nekatere vrste cianobakterij lahko vežejo dušik iz zraka (Bucka, 1989), česar drugi fitoplanktonski organizmi niso sposobni.

Obstaja tudi hipoteza paše, ki vključuje prehrabene navade zooplanktona. Ta se raje kot s toksičnimi cianobakterijami prehranjuje z drugimi fitoplanktonski organizmi (Bucka, 1989).

Hipoteza, ki temelji na koncentracijah CO<sub>2</sub> in z njimi povezanim pH-jem, razlaga zakaj pri visokem pH in/ali pri nizki koncentraciji CO<sub>2</sub> prevladajo cianobakterije nad algami in obratno. Ta velja danes za najbolj priznana hipotezo (Shapiro, 1990). Zmožnost kopičenja CO<sub>2</sub> cianobakterijam omogoča preživetje, kadar je njegova koncentracija nizka. Z aktivnim transportom in kopičenjem anorganskega ogljika (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>2</sub>) si zagotovijo povišane koncentracije CO<sub>2</sub> okoli karboksosomov, ki vsebujejo encim RuBisCo (Price *in sod.*, 1998).

Poleg vseh teh hipotez je potrebno upoštevati tudi prisotnost mikrocestinov (MC) in drugih biološko aktivnih snovi. Hepatotoksične ciklične peptide MC lahko sintetizirajo pri zelo nizkih intenzitetah svetlobe in vse do 100 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (Sedmak in Kosi, 1998; Utkilen in Gjolme, 1992), z optimalno intenziteto pri 50 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (Utkilen in Gjolme, 1992). Zanimivo je, da MC pospešujejo delitev cianobakterij. Sevom, ki proizvajajo MC, je kljub motnosti vode, ki nastopi zaradi velikega števila organizmov med nastajanjem cveta, omogočena maksimalna sinteza hepatotoksičnih cikličnih peptidov, kar omogoči še večjo celokupno sintezo MC in s tem pospešeno delitev. Po tem principu pozitivne povratne

zanke se cianobakterije, ki proizvajajo MC, lahko prekomerno namnožijo (Sedmak in Kosi, 1998; 2002).

### 2.1.3 Zelene alge s poudarkom na vrsti *Scenedesmus quadricada* (Breb.)

Zelene alge (*Chlorophyta*) so različnih morfoloških oblik: ločimo enocelične, kolonijske, kokoidne in filamentozne. Pogosta je prisotnost bičkov. Ena glavnih značilnosti zelenih alg so kloroplasti, ki jim dajejo značilno zeleno barvo in ime. Kloroplasti so obdani z dvojno membrano, vsebujejo klorofil *a* in *b* ter različne pomožne pigmente, kot so  $\beta$ -karoteni in ksantofili. Vsaka celica vsebuje znotraj kloroplasta dobro viden pirenoid, ki je povezan z nastankom zrn škroba, ki so rezerva polisaharidov. Zanimivo je, da mitotična delitev zelenih alg poteka brez centriolov (Van den Hoek *in sod.*, 1995). Rast in delitev zelenih alg uravnavajo svetloba, zaloga hranil (zelo pomembno je razmerje dušik : fosfor in mikrohranila), temperatura, stopnja fotosinteze in metabolizma. Na njihovo število v vodnem telesu vplivata tudi procesa usedanja in izginjanja zaradi prehranjevanja zooplanktona in višjih organizmov (Harper, 1992).

Nekatere vrste zelenih alg imajo površinske strukture: spine, zobce, bodice ipd. Stopnja razvitosti celičnih izrastkov ima velik vpliv na lebdenje celic; več kot jih celica ima, lažje lebdi v vodi. S stopnjo razvitosti izrastkov je povezano tudi fototaktično odzivanje na svetlobo, saj si celice s tem omogočajo optimalno osvetlitev. Spremenljivost v obliki, številu in položaju izrastkov določene vrste je posledica rasti v različnih razmerah (Pickett-Heaps, 1975).

Zelena alga *Scenedesmus* je v naravi splošno razširjen predstavnik družine *Coelastraceae* iz skupine zelenih alg *Chlorococcales*. V zmerno onesnaženih stoječih vodnih telesih ali počasi tekočih površinskih vodah je najbolj poznan predstavnik *S. quadricada*. Vegetativne celice so elipsoidne oblike, velike  $8 - 42 \times 3 - 15 \mu\text{m}$  in redko same (Van den Hoek *in sod.*, 1995). Pogosto so celice druga ob drugi, združene v cenobije, ki štejejo 2-8 celic, najpogosteje 4. Cenobij ima eno ali več spin, ki izhajajo iz vsakega pola zunanjih, bolj redko pa tudi iz notranjih celic. Vse to omogoča enostavno razpoznavanje in nezamenljivo sistematsko uvrstitev (Pickett-Heaps, 1975).

## 2.2 FIZIKALNO - KEMIJSKI DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA FITOPLANKTON

V tem poglavju bom skušala pojasniti fizikalno-kemijske, v naslednjem pa tudi biološke dejavnike, ki vplivajo na rast in delitev cianobakterij in drugih fitoplanktonskih organizmov v površinskih vodnih telesih. Pri tem bo poudarek na dejavnikih, ki vplivajo na kompeticijo med njimi. Zelo veliko dejavnikov vpliva na rast in reprodukcijo cianobakterijskih celic in tudi na tvorbo toksinov, alelopatskih snovi in metabolitov, s katerimi cianobakterije še dodatno vplivajo na svojo rast in delitev kakor tudi na ostale fitoplanktonske organizme.

### 2.2.1 Svetloba

V vodnih sistemih je svetloba eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vpliva na rast in razmnoževanje fitoplanktona. Mur in Gons (1978) opozarjata, da je svetloba, ki je dejansko na razpolago celicam, odvisna tudi od motnosti vode. Motnost je lahko posledica suspendiranih organskih in anorganskih delcev in/ali fitoplanktonskih organizmov. Tako mnogokrat pride do samo-senčenja, kar zavira nadaljnje povečanje produktivnosti, ne glede na to, da je na razpolago dovolj hranil.

Vpliv svetlobe na rast in delitev fitoplanktona lahko ocenjujemo na različne načine. Najbolj očitni odnos je vpliv intenzitete svetlobe na stopnjo rasti ( $\mu$ ). Odnose med intenziteto svetlobe in rastjo moramo ugotavljati v precej razredčenih kulturah oz. suspenzijah, da vsi organizmi dobijo enako količino svetlobe. Najbolj primerna metoda so turbidistatne tehnike s stalnimi pretočnimi sistemi, kjer se bo le majhen del svetlobe absorbiral, večji del pa bo prepuščen skozi suspenzijo celic (Mur, 1995).

Energijsko ravnotežje fototrofne rasti je opisano z enačbo:

$$\mu = q_E \cdot c - \mu_e$$

kjer je  $\mu$  specifična stopnja rasti,  $\mu_e$  specifična stopnja vzdrževanja,  $q_E$  specifični prevzem svetlobne energije in  $c$  rastni faktor izkoristka pretvorbe svetlobne energije v celični material. Vrednost  $\mu_e$  za cianobakterije je izredno nizka (npr. *Oscillatoria* ~ 0,001/h) v primerjavi z evkarionti (npr. *Scenedesmus* ~ 0,008/h). Vrednost  $c$  je odvisna od stopnje rasti, vendar se med prokarioti in evkarionti zelo malo razlikuje. Cianobakterije v primerjavi z zelenimi algami lahko izkoriščajo tudi nižje intenzitete svetlobe zaradi nizke  $\mu_e$  in prerazporejanja pigmentov (Mur, 1995).

Izraba razpoložljive svetlobe je v vodnih telesih zelo nizka, navadno manj kot 1 % svetlobe, ki pride do vodne površine, kar je mnogo manj od izrabe svetlobe pri fotosintezi kopenskih organizmov (Wetzel, 1975). Študije z različnimi vrstami cianobakterij (*M. aeruginosa*, *Oscillatoria agardhii* in *Aphanizomenon flos-aquae*) podpirajo domnevo, da je večina cianobakterij v celinskih vodah izjemno občutljiva na visoke intenzitete svetlobe (Mur, 1995). Zato je uravnavanje položaja v vodnem stolpcu zelo pomembno. Nekatere vrste fitoplanktona z učinkovito regulacijo vzgona poiščejo ustrezne intenzitete svetlobe v različnih plasteh vodnega stolpca in tam tvorijo gosto populacijo, medtem ko so vrste z manj učinkovito regulacijo bolj odvisne od mešanja vodnih mas (Mur, 1998).



Svetloba lahko vpliva tudi neposredno na ekspresijo genov fitoplanktona. Dittmann in Erhard (2001) sta dokazala, da je ekspresija nekaterih genov v cianobakteriji *M. aeruginosa* odvisna od svetlobe. V divjem tipu cianobakterije *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 so identificirali gene *mcyB* (gen za MC), *mrpA* (ang. *microcystin related protein, slo. z mikrocinu povezan protein*) in v njegovi bližini tudi *mrpB*. Ugotovili so, da se izražanje gena *mrpA* pri osvetljevanju z modro svetlobo zelo poveča. V mutanti *M. aeruginosa* PCC 7806, ki ima okvarjen gen *mcyB*, ni prišlo do tvorbe proteina MrpA, saj je ekspresija gena *mrpA* močno zmanjšana, ne glede na osvetljevanje z različnimi valovnimi dolžinami. To nakazuje neposredno povezanost ekspresije *mrp* in *mcy* genov, kar pomeni, da tudi gene za MC na nek način uravnava svetloba.

### 2.2.1.1 Energijsko ravnovesje

Svetlobna energija na eni strani s fotosintezo omogoča in na drugi strani z fotoinhibicijo omejuje rast populacije fototrofnih organizmov. Stopnja prevzema svetlobne energije je sorazmerna stopnji celične sinteze:

$$q_E = q_E(\text{rast}) + q_E(\text{vzdrževanje})$$

$$\frac{dE}{dt} \cdot \frac{1}{x} \cdot c = \mu + \mu_e$$

kjer je  $q_E(\text{rast})$  del specifičnega prevzema svetlobne energije, ki je na razpolago za rast in  $q_E(\text{vzdrževanje})$  del specifičnega prevzema svetlobe, ki je na razpolago za vzdrževanje bazalnega metabolizma,  $E$  svetlobna energija,  $t$  čas,  $\mu$  specifična stopnja rasti ( $\text{h}^{-1}$ ) in  $\mu_e$  specifična stopnja vzdrževanja ( $\text{h}^{-1}$ ). Koeficient  $c$  je faktor izkoristka pretvorbe svetlobne energije v organski celični material. Za zelene alge, ki rastejo z amonijem kot virom dušika, je vrednost  $c$  med 0,25 in 0,33. Alge, ki rastejo z nitratom, imajo vrednosti  $c$  med 0,19 in 0,26. Ker prihaja med fotosintezo do obsežnih izgub energije, npr. med prenosom energije od antenskih k reakcijskim centrom, je logično, da so najvišje vrednosti  $c$  možne pri nizkih intenzitetah svetlobe (Mur, 1995).

### 2.2.1.2 Vpliv dnevno-nočnih intervalov na rast

Rast je lahko zmanjšana tudi zaradi zmanjšane svetlobe v določenih časovnih periodah. Celice rastejo med svetlo periodo z energijo iz fotosinteznih reakcij, med temno periodo pa s porabo zalog ogljikovih hidratov. V stacionarni fazi rasti se zaloge, nastale med svetlo periodo, v temni periodi popolnoma porabijo. Zaloga ogljikovih hidratov je največja na koncu svetle faze in lahko znaša do 40 % suhe teže. Povečanja biomase med svetlo periodo ne smemo pripisati samo rasti, temveč tudi proizvajanju in kopičenju ogljikovih hidratov. Uporaba razpoložljive energije je zelo natančno uravnana; sinteza proteinov se poveča, takoj ko se koncentracija ogljikovih hidratov zmanjša (Mur, 1995).

### 2.2.1.3 Svetloba kot selektivni dejavnik pri razporeditvi fitoplanktonskih vrst

Cianobakterije in zelene alge so dobro prilagojene na naravni cikel svetlobe in teme. Sinteza rezervnih produktov je veliko bolje uravnana kot pri heterotrofnih. Rezervni produkti so v okolju s spremenljivo dostopnostjo energije ključnega pomena za

vzdrževanje celične sinteze čez vso 24-urno periodo. Cianobakterije se težko prilagajajo dolgo trajajočim visokim intenzitetam svetlobe ( $I_S$ ). Morda gre to pripisati prokariotski naravi. Odsotnost zapletenih celičnih struktur naredi celico občutljivejšo, po drugi strani pa enostavne celične strukture omogočajo izkoriščanje nizkih  $I_S$ . Dejstvo je, da pri nizkih  $I_S$  cianobakterije nadvladajo zelene alge, tako v laboratorijskih poskusih kot v naravi (Mur, 1995). V naravnih cvetovih *Microcystis* sp. so majhne kolonije pred fotoinhibicijo zaščitene z velikimi kolonijami, ki prevladujejo v zgornjih plasteh (Ibelings in Mur, 1992).

Fototrofni organizmi v vodnih telesih so izpostavljeni gibanju vodnih mas, bodisi zaradi pretočnosti vodnega telesa bodisi zaradi vetra, in izmenjujočim periodam svetlobe ter teme. Celoten izkoristek pretvorbe svetlobne energije v biomaso igra pomembno vlogo v kompeticiji med fitoplanktonskimi organizmi. V splošnem zelenim algam v konstantnih razmerah ustrezajo višje  $I_S$  kot cianobakterijam, ki v stalnih razmerah zelo dobro uspevajo pri nizkih  $I_S$ . Podatki, zbrani s sočasnim merjenjem fluorescence in kisika, kažejo na hitro zmanjšanje fotosinteze po izpostavi visokim  $I_S$ . V temi pride do hitrega okrevanja, kar nakazuje, da gre le za negativno povratno zanko, ne pa za uničenje komponent fotosinteznega aparata. Sproščanje kisika kaže počasnejšo kinetiko okrevanja po spremembi svetlobe iz visokih  $I_S$  v temo. Da se izognejo fotoinhibiciji (prevelika ekscitacija fotosintezne elektronske verige), imajo cianobakterije relativno veliko zalogo in hitro reoksidirajo plastokinon. Tesna povezava med fotosintezno in dihalno verigo v membranskih sistemih je še dodatna prednost za cianobakterije. Tok elektronov preko oksidaze citokroma c je značilen za cianobakterije in predstavlja prednost v razmerah nizke  $I_S$ . Tudi vloga karotenoidov kot zaščitnih pigmentov prispeva k manjši fotoinhibiciji. Cianobakterije so zmožne preživeti periode zelo visokih  $I_S$ , posebej če so na to že prej prilagojene. V naravi igra zelo veliko vlogo vzajemno senčenje celic v kolonijah. Kadar pride do poškodb fotosistema II (FS II), so cianobakterije sposobne relativno hitrega popravila določenih komponent (Schubert *in sod.*, 1995).

### 2.2.2 Temperatura

Različne fitoplanktonske cianobakterije imajo optimalno rast pri različnih temperaturah. Vrsta *Oscillatoria rubescens* na primer preživi celo pozimi pod ledom. Druge (predvsem iz rodov *Microcystis* in *Anabaena*) uspevajo pri višjih temperaturah in se masovno razvijajo v poletnih mesecih na površini vodnih teles (Shapiro, 1990). Različne vrste fitoplanktona imajo različne temperaturne optimume. Fong *in sod.* (1993) so preučevali mešane združbe fitoplanktonov in makrofitov, ki se pojavljajo v plitkih vodnih telesih. Končna biomasa fitoplanktona in cianobakterijskih kolonij je bila največja pri temperaturi 25°C, biomasa makrofitov pa med 18 in 22°C. Razlike v temperaturnih optimumih v monokulturah in mešanih kulturah so lahko posledica interakcij med skupinami, npr. senčenje in kompeticija. Temperature pogojujejo tudi sezonsko pojavljanje fitoplanktona v plitvih vodnih telesih (Fong *in sod.*, 1993).

Prav tako je zanimivo, kako je temperatura vode posredno povezana z drugimi dejavniki. Vpliv herbicidov na fitoplankton je npr. odvisen tudi od temperature. Laboratorijski poskusi z monokulturo cianobakterije *Oscillatoria limnetica* so pokazali, da je občutljivost na herbicid atrazin naraščala s padanjem temperature (Berard *in sod.*, 1999).

### 2.2.3 Hranila

Določene specifične fiziološke lastnosti lahko cianobakterijam zagotovijo prilagoditvene prednosti, seveda le v določenih razmerah v okolju. Sposobnost vezave atmosferskega dušika omogoča nekaterim cianobakterijam, da prevladajo, kadar primanjkuje v vodi raztopljenega dušika. Poleg tega zmorejo cianobakterije shranjevati relativno velike količine fosforja in dušika. To predstavlja prednost pred drugimi fitoplanktonskimi organizmi, kadar so koncentracije hranil v vodi zelo spremenljive. Kadar primanjkuje anorganskih hranil, so mnogi fitoplanktonski organizmi sposobni uporabiti hranila, ki so vezana v različnih organskih molekulah (Reynolds, 1997).

#### 2.2.3.1 Makrohranila in mikrohranila

Skoraj vse fitoplanktonske celice za svoje življenje potrebujejo približno 20 elementov, od tega večino v zelo majhnih koncentracijah (mikrohranila). Koncentracije nekaterih so praktično zanemarljive, npr. bor in vanadij sta potrebna v tako minimalnih koncentracijah, da jih v laboratorijska gojišča za alge sploh ne dodajamo. Magnezij, molibden, železo, baker in cink je potrebno dodati v majhnih količinah, vendar spremembe in reakcije različnih spojin lahko ovirajo dostopnost do teh elementov. Nekatero skupino alg potrebujejo precej kalcija in silicija (diatomeje). V naravi le redko primanjkuje natrija, kalija, magnezija in klor. Ti elementi namreč sestavljajo soli, ki so nujno potrebne za neoviran razvoj fitoplanktona. Glavna hranila sestavlja skupina šestih elementov: ogljik, vodik, kisik, dušik, fosfor in žveplo. V neobremenjenih, oligotrofnih vodnih sistemih največkrat zasledimo pomanjkanje dušika ali fosforja. Moramo se zavedati, da nam kemijska analiza vsebnosti hranil v vodi ne pove veliko o njihovi dostopnosti za žive organizme (Reynolds, 1997).

Dušik je nujno potreben za sintezo aminokislin in proteinov, ki predstavljajo 1/8 do 1/6 teže fitoplanktonske celice. Fitoplankton najpogosteje uporablja nitrat, nitrit in amonij, pa tudi ureo in proste aminokisliline. Nekatero filamentozne cianobakterije (*Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Gleotrichia*, *Trichodesmium*) imajo heterociste, v katerih so sposobne fiksacije atmosferskega dušika. Povprečna vrednost dušika v celinskih vodah je 10 do 100 µg/l. V vodah blizu naseljenih območij in območij z intenzivnim kmetijstvom se vrednost dušika povzpne do 10 mg/l. Fosfor je dostopen v obliki ionov ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) in v organskih spojinah. Topnost fosforja iz mineralov je namreč relativno slaba, zato je fosfor pogosto tisto hranilo, ki omejuje rast fitoplanktonskih organizmov (Reynolds, 1997).

### 2.2.4 Snovi, vnesene zaradi delovanja človeka

Vsaka snov, ki je vnesena v nek ekosistem, ima na ta ekosistem vpliv, bodisi posreden bodisi neposreden. Snovi, vnesene zaradi delovanja človeka, so za vodne organizme lahko na eni strani strupene, lahko poškodujejo ali celo uničijo celice, na drugi strani pa lahko spodbudijo njihovo rast. Znanih je veliko primerov, da visoke koncentracije hranil, ki se kopičijo v vodah zaradi delovanja človeka, pripomorejo k nastanku toksičnega cveta cianobakterij (Sedmak in Kosi, 1997 a in b; 2002).

Ekotoksikološki pomen npr. herbicidov v vodnih sistemih je precej zapleten in ga ne moremo izmeriti samo na osnovi kratkotrajnih laboratorijskih toksikoloških testov, temveč moramo izvesti tudi dalj časa trajajoče poskuse in opazovati različne interakcije. Obstaja več pomembnih dejavnikov, ki so vpleteni v odgovor cianobakterij na herbicide. Pomembna je tako struktura fitoplanktonske združbe, kakor tudi povezave med vrstami znotraj združbe in različni fizikalno-kemijski dejavniki. Medsebojni vplivi vseh teh dejavnikov lahko zvečajo ali zmanjšajo občutljivost fitoplanktona na herbicide in na ta način vplivajo na zvečanje oz. zmanjšanje vplivov onesnaževal v vodnih sistemih (Berard *in sod.*, 1999).

## 2.2.5 Mešanje, tonjenje in lebdenje fitoplanktona

Specifična teža planktona je običajno za 2 do 5 odstotkov večja od specifične teže vode, zato planktonski organizmi počasi tonejo. Čeprav je gibanje fitoplanktona v največji meri odvisno od mešanja vodnih mas, se fitoplankton, ki je sposoben uravnavanja položaja, čez dan zadržuje blizu vodne površine in počasi tone, da se izogne fotoinhibiciji, proti večeru pa potuje navzgor. Če pride do pomanjkanja hranil na površini, celice tonejo do nutrikline. V drugi polovici dneva običajno potujejo navzdol. Planktonske celice skušajo najti kar najboljši kompromis med svetlobo in hranili, tako lahko nastanejo goste agregacije (Flynn in Fasham, 2002).

Negibljivi plankton, v smislu toge celične stene in odsotnosti bičkov ali migetalk, tone zaradi gravitacije ( $g = 9.8081\text{m/s}^2$ ). Če gre za kompaktne oblike celic, procesi tonjenja in vzgonskega lebdenja ne povzročajo turbulenc. Plovnost za sferične delce lahko matematično zapišemo s Stokeovo enačbo (v enotah m/s):

$$W_s = g d^2 (\rho_c - \rho_w) / (18\eta)$$

pri čemer je  $W$  plovnost,  $g$  gravitacija,  $d$  velikost celice,  $\rho_c$  gostota celice,  $\rho_w$  gostota vode in  $\eta$  viskoznost vode. Po dogovoru predstavlja pozitivna vrednost  $W$  premik navzdol in negativna vrednost  $W$  premik navzgor (Reynolds, 1997).

Tonjenje oz. usedanje celic zavirajo mikrotokovi in prilagoditve kot so oljne kapljice in plinski mehurčki v celicah, sluzaste ovojnice, trni, izrastki, podaljšani deli celic, nastanek kolonij pri cianobakterijah ipd. (Reynolds, 1984). Povprečna gostota celic je redko manj kot  $1050\text{ kg/m}^3$ . Različni vključki, npr. polifosfatne granule in eksoskeletne strukture iz kalcita ali silicija, še povečajo gostoto. Gostota celic se zmanjša ob prisotnosti plinskih vključkov, lipidov ( $860\text{ kg/m}^3$ ) in perifernih polisaharidov ter sluzi, vendar se velikost delcev (celic ali kolonij) ne sme preveč povečati. Velika kolonija *Microcystis* sp. je opremljena s sluzjo in plinskimi vključki ( $d = 200\ \mu\text{m}$ ,  $\rho_c = 985\text{ kg/m}^3$ ) in lahko potuje z vzgonom do  $3,3\text{ mm/s}$ . Omenili smo že, da je ena izmed strategij prevlade cianobakterije *M. aeruginosa* zelo učinkovito uravnavanje gibanja. S pomočjo znotrajceličnih plinskih vakuol potujejo navzgor ali vsaj upočasnijo tonjenje, medtem ko se s tvorbo balastnih snovi, ki so povezane s fotosintezno aktivnostjo, spuščajo v globlje plasti vode (Walsby, 1994).

Poleg velikosti in gostote je za procese tonjenja in lebdenja zelo pomembna oblika celice. Delci različnih oblik (oblika kapljice je izjema) tonejo počasneje kot sferične oblike enakih

volumnov in gostote. Ta princip s pridom uporabljajo mnoge planktonske alge, npr. rogovi – *Ceratium*, spine – *Scenedesmus*, podaljšani vogali celice – *Staurastum*, ravni laski – *Thalassiosira* (Reynolds, 1997). Nekatere alge imajo sposobnost premikanja v vodi z bički. Pomikajo se v tisto plast, ki je za njihovo fotosintezno aktivnost najugodnejša. Alga *S. quadricauda* je razvila prilagoditve s podaljšano obliko posamezne celice, s tvorbo cenobijev in s površinskimi izrastki, spinami (Pickett-Heaps, 1975).

Za raziskovanje dinamike dnevnih migracij majhnih delcev (fitoplankton, partikularni organski ogljik ipd.) v večjih vodnih telesih je zelo uporabno optično orodje (*ang. transmissiometer*), katerega signal je kvantitativno povezan z biološkimi procesi (Gardner *in sod.*, 1993). Laboratorijski poskusi v 3-metrskih valjih iz pleksi stekla z dinoflagelatom *Prorocentrum micans* so pokazali, da se celice zadržujejo v zgornjih plasteh popoldne, preostali del dneva pa so razporejene naključno. V naravi iste celice kažejo negativno fototaksijo zgodaj popoldne in pozitivno fototaksijo zjutraj in ponoči (Eggersdorfer *in sod.*, 1991). Vrste, ki so sposobne gibanja z bički, vplivajo na svojo vertikalno razporeditev tudi, ko pride do močnega mešanja zaradi vetra (Yamazaki in Kamykovski, 1991).

#### 2.2.6 Kisik, ogljikov dioksid

Koncentracijo kisika in stopnjo celotne fotosintezne aktivnosti v cianobakterijskih cvetovih se meri s kisikovimi mikroelektrodami. Ibelings in Mur (1992) sta v laboratorijskih razmerah proučevala nastanek treh različnih tipov cianobakterijskega cveta *Microcystis* sp. Ugotovila sta, da v gostem cvetu stopnja osvetlitve in velikost kolonij določata globino najbolj primerne prostora za fotosintezo, stopnjo fotosinteze in s tem povezano koncentracijo kisika. Koncentracija kisika v cvetu, ki je sestavljen iz malih kolonij (< 55  $\mu\text{m}$ ) je večja od koncentracij v cvetu velikih kolonij (> 300  $\mu\text{m}$ ), vendar so majhne kolonije hitreje podvržene fotoinhibiciji.

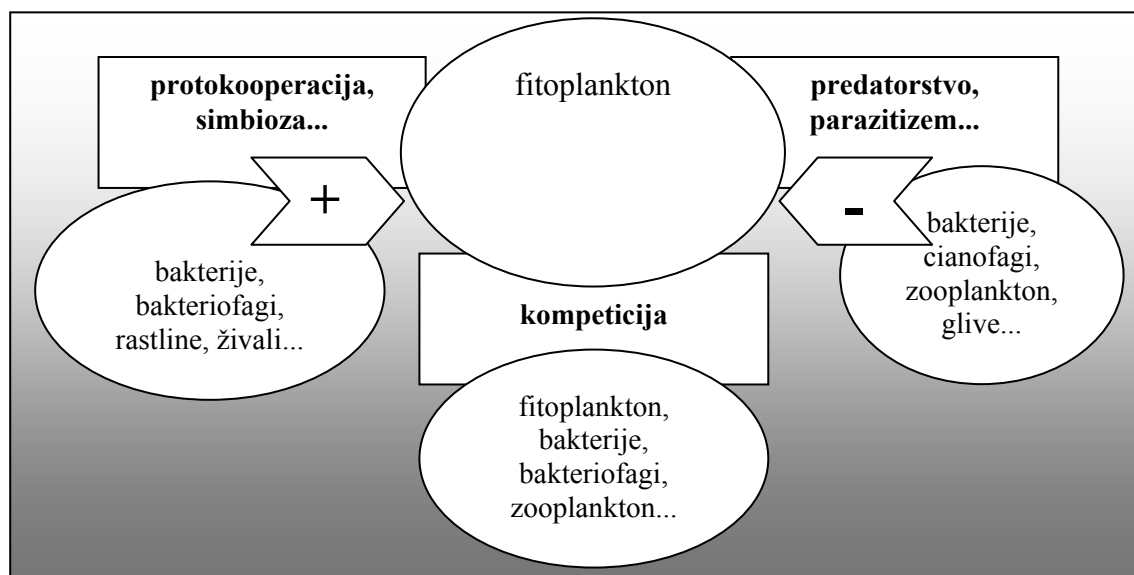
Planktonski fotoavtotrofi večino ogljika dobijo s prevzemom  $\text{CO}_2$ , ki je raztopljen v vodi. Topnost  $\text{CO}_2$  je odvisna od atmosferskega pritiska. Prevzem  $\text{CO}_2$  s fotosintezo se odraža v povečanju vrednosti pH (Reynolds, 1997). Dokazano je, da imajo fitoplanktonske cianobakterije raje nevtralno do alkalno vodno okolje (Pearl, 1988). Vsebnost  $\text{CO}_2$  in  $\text{HCO}_3^-$  je odvisna tudi od matične kamenine. Če je matična podlaga karbonatna, v jezerih zmernega podnebja ponavadi ne primanjkuje  $\text{CO}_2$  in  $\text{HCO}_3^-$ , četudi je stopnja fotosinteze zelo visoka (Mur in Gons, 1978).

### 2.3 BIOLOŠKI DEJAVNIKI IN INTERAKCIJE MED FITOPLANKTONOM

Kadar govorimo o vplivu dejavnikov na skupino organizmov v okolju, se moramo zavedati, da gre za zelo zapleten sistem, kjer so skoraj vsi elementi med seboj povezani in prepleteni v zelo različne odvisnosti. V tem delu pregleda objav skušam različne dejavnike prikazati sistematično, vendar je zaradi prepletenosti vseh to skoraj neizvedljivo. V mozaiku kamenčkov, ki sestavljajo neko ogromno sliko, je zelo težko določiti, kateri so bolj in kateri manj pomembni za cel mozaik.

Zadeva je zelo zapletena že na nivoju vpliva različnih fizikalnih in kemijskih dejavnikov v nekem vodnem telesu, temu pa se pridružujejo še biološki dejavniki. Biološke dejavnike lahko glede na način vpliva na fitoplankton razdelimo na tri skupine: (1) pozitivni, npr. protokooperacija in simbioza, (2) negativni, npr. predatorstvo in parazitizem ter (3) kompeticijski (Slika 1).

Zanimiv pristop k proučevanju fizikalnih in bioloških dejavnikov so simulacije. Varela *in sod.* (1994) so izdelali simulacijske analize različnih parametrov, ki vplivajo na maksimum klorofila na različnih globinah oligotrofnih voda. Za oceno gostote fitoplanktonske populacije se namreč velikokrat uporablja merjenje fotosinteznih pigmentov - klorofilov. Ideja o modelu ni čisto nova, novi pa so pristopi, ki upoštevajo mnoge fizikalne (svetloba, zaloga nitratov, vrtnčenje vode) in biološke parametre (fitoplankton, zooplankton, ekskrecija heterotrofov, primarna produkcija, itd.). Tudi tu se izkaže, da je svetloba in njena valovna dolžina ključnega pomena za razporeditev fitoplanktona. Ta študija potrjuje uporabnost sklopljenih fizikalnih in bioloških modelov kot orodje za »ekološko računanje«, saj omogoča analizo posameznega procesa tako, da lahko optimiziramo poskuse v laboratoriju in v naravi.

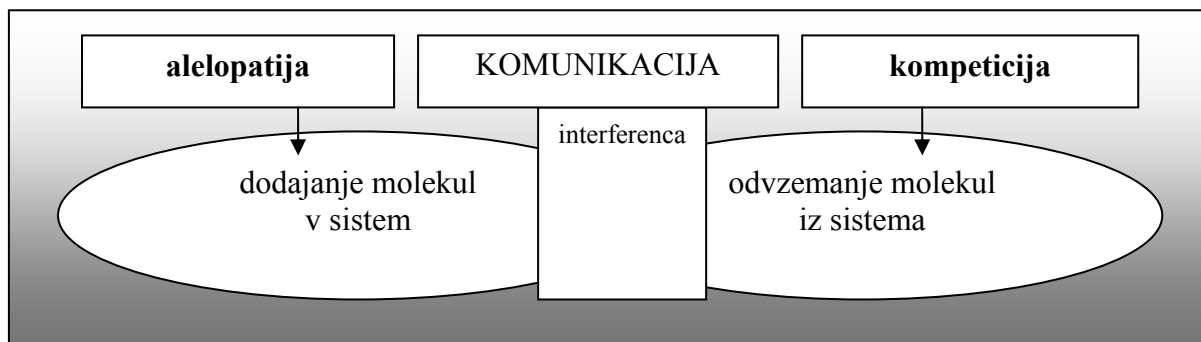


Slika 1: Shematski prikaz pozitivnih, negativnih in kompeticijskih odnosov med fitoplanktonskimi organizmi in drugimi organizmi v vodnem telesu.

### 2.3.1 Interakcije med fitoplanktonskimi organizmi

Obstaja mnogo dokazov, da fitoplanktonski organizmi med seboj komunicirajo s snovmi, ki jih izločajo v vodno okolje. Poudariti moramo, da lahko koncentracije snovi tudi na majhnih razdaljah izjemno nihajo zaradi mikrookolij bodisi zaradi fizikalnih bodisi bioloških posebnosti (npr. kolonije, polisaharidni ovoji, sluzi...). Splošno je znano dejstvo, da mikroorganizmom intra- in inter-specifični kemični signali dovoljujejo, da na spremembe v okolju odgovorijo z regulacijo transkripcije genov. Verjetno gre tudi v primeru fitoplanktonskih organizmov za mehanizme zaznavanja celične gostote (*ang. quorum sensing*).

Komunikacija med cianobakterijami še ni dobro raziskana, čeprav obstaja kar nekaj raziskav, ki nakazujejo možnost sporazumevanja med cianobakterijami. V literaturi najdemo podatke o vplivih cianobakterijskega metabolita geosmina na rast in delitev zelenih alg (Sklenar, 1999), alelopatskih interakcijah dinoflagelati – cianobakterije (Vardi, 2002), zaviranju rasti in delitve cianobakterij z alelopatskimi snovmi makrofitov (Nakai, 1999; Gross *in sod.*, 1996) in mnogo raziskav o kompeticiji med fitoplanktoni (Drakare, 2002; Grover, 2002; Kuwata *in sod.*, 2000; Lukin, 2003; Mur *in sod.*, 1977). Alelopatija pomeni zaviranje ene rastlinske vrste z drugo. Razlike med kompeticijo in alelopatijo obstajajo (Slika 2), čeprav je v konkretnih primerih to včasih težko dokazati (Schagerl *in sod.*, 2002). Obstajajo celo matematični modeli planktonske kompeticije in alelopatije (Mukhopadhyay *in sod.*, 1998), ki slonijo na modificiranem Lotka-Volterra tipu kompeticije med dvema sočasno bivajočima združbama. Alelopatski učinek je v tem modelu vključen kot tvorba alelopatske snovi v vsaki od vrst. Novo nastale planktonske celice rabijo nekaj časa, da odrastejo in začnejo izdelovati učinkovite alelokemikalije, zato je v model vključen tudi ta zakasnitveni moment. Opazili so, da zakasnitev ne sproži nestabilnosti; povedano drugače, zamuda je popolnoma neškodljiva, če gre za alelopatijo inhibitornega (toksinskega) tipa. Po drugi strani prevelika zamuda destabilizira sistem in vodi v omejevanje stabilnih periodičnih pojavov po delitvi celic, če je modelni sistem stimulatornega (avksinskega) tipa. Postulat, da alelopatske povezave (toksične in avksinske) uravnavajo uravnoteženo fitoplanktonsko ekologijo, je bil dokazan in podprt z mnogimi eksperimentalnimi sistemi (Mukhopadhyay *in sod.*, 1998). Alelopatija je velikokrat opisana kot dejavnik, ki nadzoruje cvetenje in sukcesijo fitoplanktonskih vrst v vseh tipih vodnih teles. Kljub mnogim eksperimentalnim študijam, so matematični modeli zelo redki. Vendar je treba poudariti, da avtorji priznavajo, da je v matematični model težko zajeti prav vse povezave.



Slika 2: Shematski prikaz razlike med kompeticijo in alelopatijo.

Zanimivo je, kako snovi, ki jih cianobakterije sintetizirajo in izločajo, vplivajo na sestavo fitoplanktonske populacije. Podatki iz naravnih ekosistemov kažejo na zmanjšanje raznovrstnosti fitoplanktonskih vrst med toksičnim cvetenjem cianobakterij iz rodu *Microcystis* in nakazujejo potencialne alelopatske povezave med cianobakterijami in drugimi fitoplanktonskimi vrstami (Hagmann in Jüttner, 1996; Keating, 1977; Matern *in sod.*, 2001; Schagerl *in sod.* 2002; Sedmak in Kosi 1998, 2002).

Da bi proučili vpliv snovi, ki jih izločajo alge in cianobakterije, na fitoplanktonske vrste, so Sukenik *in sod.* (2002) različnim kulturam alg in cianobakterij dodali porabljene medije, iz katerih so odstranili celice. Tak porabljen medij brez celic vsebuje snovi, ki so jih celice, ko so v njem rasle, vanj izločile, zato lahko vpliva na rast in delitev drugih fitoplanktonskih organizmov. Dodatek takega porabljenega medija iz celic *Microcystis* je inhibiral fotosintezo fitoplanktonskih alg v razponu od 40 do 95 %. Dodatek cianobakterijskega porabljenega medija različnim cianobakterijam je inhibiral fotosintezo manj kot 40 %. Zelo zanimiv je vpliv dodatka porabljenega medija iz celic *Microcystis* algi *S. quadricauda*; stopnja fotosinteze ni inhibirana temveč povečana. V tej študiji cianobakterijskih izvlečkov in izvlečkov iz alg, se je jasno pokazalo, da lahko cianobakterije izločajo v svoje okolje toksične snovi in tako vplivajo na ostale cianobakterije in alge. Občasno cvetenje cianobakterij vpliva na vse trofične nivoje v vodnem ekosistemu. Medtem ko je rast in delitev večine fitoplanktonov zaradi določenih snovi inhibirana, lahko drugi znotraj novih razmer s pomočjo aklimacijskih mehanizmov najdejo optimalne razmere za rast in delitev. Zaenkrat še ne vemo, ali so v procesu zaviranja rasti in delitev vpleteni MC ali druge alelopatske snovi. Singh *in sod.* (2001) so ugotovili, da MC preko zmanjšane fotosintezne aktivnosti inhibirajo delitev vrste *Nostoc muscorum* in *Anabena* sp., kar nakazuje, da je alelopatska funkcija MC mogoča.

### 2.3.1.1 Alelopatija

Alelopatija pomeni zaviranje rasti ene rastlinske vrste z drugo zaradi sproščanja toksičnih snovi (Webster, 1983). Čeprav je bil izraz vpeljan v znanstvenih krogih, ki proučujejo snovi kopenskih rastlin, se vedno pogosteje uporablja tudi v širšem krogu, npr. za opisovanje odnosov med evkariontskimi in/ali prokariontskimi fitoplanktonskimi populacijami. Razvoj cianobakterijskega cveta je v veliki meri odvisen od fizikalnih in kemijskih ter v manjši meri tudi od nemetabolnih (kompeticija) in metabolnih (alelopatija) vplivov drugih fitoplanktonov (Keating, 1977).

Odzive različnih fitoplanktonskih vrst v toksičnem cvetu lahko pripišemo različnim fiziološkim stanjem ali aktivnemu spreminjanju okolja z alelosovmi, ki jih dominantne cianobakterije proizvajajo in izločijo v svoje okolje. V mnogih primerih je težko pridobiti neposreden dokaz za alelopatske povezave v naravnem okolju, zato moramo podrobno proučiti te povezave v nadzorovanih laboratorijskih razmerah.

Schagerl *in sod.* (2002) so raziskovali alelopatijo med cianobakterijami in algami v evtrofnem jezeru. Masovno pojavljanje cianobakterij je sovpadalo z velikim zmanjšanjem števila zelenih alg. Poleg sprememb v koncentracijah hranil tudi alelopatski učinki lahko prispevajo k prevladovanju cianobakterij. Vpliv alelopatije so raziskovali s testom difuzije na ploščah. Vrste z nizko biomaso lahko ob pomanjkanju fosforja z izločanjem alelopatskih snovi vplivajo na vrste z visoko biomaso. Zanimivo je, da v nekaterih



primerih pri cvetenju dominantna vrsta *M. aeruginosa* s testom difuzije na ploščah ne kaže alelopatskih vplivov. Cianobakterije lahko pridobijo z izločanjem biološko aktivnih snovi bistveno prednost pred ostalimi fitoplanktonskimi kompetitorji. Tako lahko vplivajo na naravno številčnost in fotosintezno aktivnost fitoplanktonskih vrst.

Nedavno so opisali alelopatsko interakcijo, kjer *Microcystis* sp. z zmanjšanjem aktivnosti ogljikove anhidraze zavira fotosintezno zmožnost dinoflagelata *Peridinium gutanense* v kulturi (Sukenik *in sod.*, 2002). Pri cianobakterijah so odkrili že precej alelopatskih snovi, vendar so jih označili kot algicide, ki neposredno zavirajo fotosintezo cianobakterij in evkariontskih alg. Zelo dobro raziskana alelopatska snov je npr. fischerellin iz cianobakterije *Fischerella musicola*. Deluje na nekatera specifična mesta v fotosistemu II, kar se kaže v različnih razpolovnih časih asociacije FS II s tilakoidno membrano (Hagmann in Jüttner, 1996). Druga taka snov je cianobakterin iz cianobakterije *Scytonema* sp., ki deluje na povezavo z oksidacijskim mestom elektronskega akceptorja kinona-B, vendar ne z mestom vezave DCMU-ja. Isto mesto so predlagali v raziskavi algicidne aktivnosti snovi iz cveta cianobakterije *Oscillatoria laetevirens*, ki inhibira rast in delitev alge iz rodu *Peridinium* (Matern *in sod.*, 2001).

#### 2.3.1.2 Kompeticija

Lukin (2003) je proučeval razvoj perifitonske združbe z izmenjavo organizmov med substratom in vodnim stolpcem z interspecifično kompeticijo za prostor. Kompeticijo za prostor je ocenil glede na zastopanosti vrst v planktonu in perifitonu. V zgodnjih stopnjah sezonske sukcesije, ko v perifitonski združbi prevladujejo diatomeje, gre predvsem za procese sedimentacije fitoplanktona. Kompeticija za podlago še ni zelo izrazita. Najprej se pritrdijo diatomeje, nanje se pritrdijo in kasneje razrastejo zelene filamentozne alge, nato se na njih pritrdijo še novi kolonizatorji iz vodnega stolpca. V zadnji fazi sezonske sukcesije, ko perifiton sestavljajo cianobakterije in diatomeje, ki tesno pokrivajo površino, je interspecifična kompeticija za površino veliko bolj pomembna kot izmenjevanje organizmov med podlago in vodnim stolpcem.

V celinskih evtrofnih vodah pogosto zasledimo masoven razvoj zelenih alg in cianobakterij. Mur *in sod.* (1998) so izvedli nekaj prvih poskusov kompeticije med zelenimi algami (rod *Scenedesmus*) in cianobakterijami (rod *Oscillatoria*) v okoljih z omejeno svetlobo. Maksimalna stopnja rasti za *Scenedesmus* je 1,58/dan, kar je veliko več kot 0,86/dan za *Oscillatorio*. Pomembno je dejstvo, da cianobakterije dobro izkoriščajo svetlobo nizkih intenzitet. Optimalna globina za *Oscillllatorio* je namreč nižja od optimalne globine za *Scenedesmus*, čeprav obe vrsti rasteta tudi v suboptimalnih globinah. Rezultati poskusov nakazujejo, da je svetloba najbolj pomemben dejavnik za regulacijo nadvlade cianobakterij.

Vodni sistemi, kjer pogosto cvetijo cianobakterije iz rodu *Microcystis*, imajo nekatere skupne značilnosti: nizek pretok vode, velik dotok hranil, visoke koncentracije dušika in/ali fosforja. V takih vodnih telesih je med fitoplanktonskimi organizmi vedno prisotna interspecifična kompeticija. Dominantne vrste lahko nadvladajo druge vrste, glede na značilnosti prevzema hranil in izločanja različnih snovi v okolje, zato lahko v zmernih klimatih v poletnem času mnogokrat pride do nadvlade vrst *Microcystis* spp. Kuwata in Miyazaki (2000) sta se osredotočila na kompeticijo med cianobakterijo *Microcystis*

*novackii*, ki pogosto cveti, in alga *Scenedesmus quadricauda*, ki je pogost predstavnik zelenih alg v eutrofnih jezerih. Z uporabo simulacijskega modela so proučevali vpliv različnih koncentracij dušika na kompeticijo v kemostatu. Kemostat z dovajanjem hranil predstavlja model, ki simulira naravni sistem, čeprav je dotok hranil v naravi precej bolj specifičen pojav. Model sloni na petih diferencialnih enačbah, ki opisujejo masno razmerje N:C v celicah vsake vrste v kemostatu. Izkazalo se je, da začetna biomasa obeh vrst nima vpliva na končno biomaso dominantne vrste. Pri nizkih pretokih prevladuje vrsta *M. novackii*, pri višjih pa *S. quadricauda*. Cianobakterija *M. novackii* lahko prevladuje nad drugimi fitoplanktonskimi organizmi in vzdrževanja zelo goste populacije. Cianobakterija *M. novackii* prevlada nad algo *S. quadricauda* pri nižjem pretoku hranil, kar kaže, da ima ta vrsta veliko zmožnost doseganja večjih gostot celic pri višjih koncentracijah dušika v dotekajočem mediju. Ti rezultati se ujemajo z opazovanji cveta cianobakterij v naravnih jezerih z majhnim pretokom, v eutrofnih in hipertrofnih vodnih sistemih. Zanimivo, čeprav kontradiktorno, je, da so škodljiva cvetenja cianobakterije *M. novackii* v naravi opazili tudi pri nizkih koncentracijah dušika. Ti rezultati nakazujejo, da prevladovanje *M. novackii* ni povezano z začetno biomaso populacije *M. novackii*, kar se ujema z rezultati, da le majhna populacija, ki preživi zimo, lahko vodi v nastanek cveta. Med parametri, ki opisujejo prevzem dušika in celično rast, so izbrali parametre, ki vplivajo na prevladovanje cianobakterije *M. novackii* pri nizkem in visokem pretoku oz. razredčitvi. Nizki pretoki so ugodni za fitoplanktonske organizme z nizko saturacijsko konstanto za prevzem dušika in z nizkimi minimalnimi celičnimi vsebnostmi dušika. Višji pretoki pa so ugodni za alge z maksimalno vsebnostjo dušika in manjšim naklonom specifične rasti proti celični vsebnosti dušika. V združbi, kjer živita več kot dve vrsti, vrsta z najnižjo ravnotežno razpoložljivostjo vira za hranilo, ki ga primanjkuje, izloči vse ostale vrste. V tej študiji ima *M. novackii* nižjo konstanto nasičenosti in minimalno vsebnost dušika v celicah v primerjavi z algo *S. quadricauda*. Druge simulacijske študije kažejo, da pride pri manjšem dotoku hranil do kompetitivne nadvlade *S. quadricauda* nad *M. novackii*, ki prevlada v razmerah višjega dotoka hranil. V nepretočnih vodnih sistemih je za prevladovanje cianobakterij iz rodu *Microcystis* odgovornih več mehanizmov in ne samo kompeticija za hrano. Med mehanizmi za prevladovanje ene cianobakterijske vrste nad ostalimi fitoplanktoni so po mnenju Kuwata in Miyazaki (2000) poleg kompeticije zelo pomembni še naslednji mehanizmi: uravnavanje plovnosti s plinskimi vakuolami, povečanje velikosti z oblikovanjem kolonij in proizvodnja ter izločanje hepatotoksičnih cikličnih peptidov; zooplankton se namreč redko hrani s toksičnimi vrstami fitoplanktona.

### 2.3.2 Interakcije fitoplanktonskih organizmov, bakterij in bakteriofagov

V laboratorijskih poskusih so primerjali potrebe po hranilih in energiji med pikofitoplanktonom in heterotrofnimi bakterijami, da bi razložili zakaj se heterotrofne bakterije večinoma pojavljajo tam, kjer ni pikofitoplanktona in obratno (Drakare, 2002). V devetih različnih razmerjih glukoze in fosfata so analizirali stopnjo rasti in končno število celic. Heterotrofne bakterije so imele povsod višjo maksimalno stopnjo rasti in v mnogih primerih so postale sorazmerno večje kot pikofitoplanktonski organizmi. V kombinacijah, kjer je primanjkovalo organskega ogljika, je to upočasnilo rast in delitev heterotrofnih bakterij. Pikofitoplankton je prevladal in kazal pozitiven odgovor na fosfor v kombinaciji z negativnim odgovorom na glukozo. Negativni odgovor na glukozo je verjetno posreden, povzročen s kompeticijsko bolj prilagojenimi bakterijami, ki uporabljajo organski ogljik

(Drakare, 2002). Zanimivo je, da lahko bakterioplankton naredi alelopatske snovi, ki jih izločajo nekateri fitoplanktonski organizmi, nedostopne in s tem onemogoči njihovo učinkovanje na druge fitoplanktonske populacije (Newhook in Briand, 1987).

Že kar nekaj podatkov je znanih o bakteriofagih oz. o cianofagih, ki so povezani s cianobakterijami, govori se celo o koevoluciji virusov in cianobakterij (Cowlshaw in Mrsa, 1975). Ugotovili so, da mnogo okoljskih dejavnikov sodeluje pri vstopu in razmnoževanju bakteriofagov: različne periode svetlobe in teme (Allen *in sod.*, 1976), temperatura v kombinaciji s svetlobo (Currier in Wolk, 1979) in svetloba v kombinaciji z Na<sup>+</sup> ioni (Cseke in Farkas, 1979). Celotna stopnja fotosinteze cianobakterij ima velik vpliv na nekatere cianofage (Adolph in Haselkorn, 1972). Raziskali so tudi vstop in razmnoževanje nekaterih virusov v cianobakterijah (Moisa *in sod.*, 1981).

### 2.3.3 Interakcije fitoplanktonskih organizmov in plenilcev (paša, parazitizem)

Varela *in sod.* (1994) so se proučevanja vplivov paše (*ang. grazing*) zooplanktona na fitoplanktonu lotili v dveh delih: ovrednotili so vplive zooplanktona na heterotrofe in velike fitoplanktonte ter vplive heterotrofov na male fitoplanktonte. Merili so maksimalno stopnjo in koeficient paše, upoštevajoč hiperbolično Michaelis-Mentenovo dinamiko. Koeficient paše se je izkazal za izjemno pomembnega za velikost in obseg maksimuma klorofila in le malo pomembnega za njegovo globino. Maksimum klorofila je namreč dobro merilo za pojavljanje fitoplanktonskih organizmov. Zanimivo je, da majhni fitoplanktonski organizmi hitreje dosežejo maksimum klorofila kot veliki.

Občasno cvetenje cianobakterij vpliva na vse trofične nivoje v vodnem ekosistemu. Zooplankton je razvil mehanizem selektivnega hranjenja s fitoplanktonom in se tako izognil zastrupitvam. Vrste vodnih bolh *Daphnia pulicartia* in *D. pulex* kažeta fiziološke in vedenjske adaptacije, ki jima omogočajo preživetje, vendar pa to ni nujno povezano s prisotnostjo MC (Burkholder, 2002).

### 2.3.4 Simbiotske povezave

Cianobakterije vzpostavijo simbiotske povezave z različnimi evkarionti: protisti (mikroalge, mikromigetalkarji), mahovi, višjimi rastlinami, glivami, spužvami, lignji, nekaterimi črvi in larvami mušic in komarjev. Večina cianobakterijskih endosimbioz je v habitatih, ki so bogati z nekaterimi hranili, vendar omejeni z drugimi viri, ki jih s simbiozo vsaj delno nadomestijo. Kot primer: asociacija *Azolla/Anabaena* je razširjena v habitatih, ki so bogati s fosforjem in revni z dušikom. Podobno nekatere enocelične cianobakterije fiksirajo dušik znotraj citoplazme nekaterih bentoških diatomej. Čeprav v večini primerov simbiotskih asociacij ni razvidno, kakšne so prednosti za cianobakterije, je jasno, da drugi simbiot s cianobakterijo pridobi prednost, ki je povezana s hranili (fiksacija N<sub>2</sub>). Vsekakor so cianobakterije zaščitene pred obiralci in patogenimi mikroorganizmi, kadar se pojavljajo kot endosimbionti (Burkholder, 2002).

### 2.3.5 Interakcije mikroorganizmov – zaznavanje celične gostote

Teorija o enoceličnem prokariontskem življenju, ki kot enocelična enota živi svoje življenje tako, da se odziva na dražljaje iz okolja, se je ohranila zelo dolgo. Šele kasneje so se začele pojavljati teorije, da je vsaka bakterija v populaciji mikrobne kulture v uravnoteženih ravnih razmerah nujno potrebna za vse ostale. Pričele so se raziskave zapletene medcelične komunikacije, ki koordinira aktivnosti posamezne celice znotraj populacije. Tako je enocelična teorija prerasla v večcelično teorijo. Velik korak pri odkrivanju interakcij med mikroorganizmi je predstavljalo odkritje signalnih molekul v mediju. Nekateri povezujejo signalne molekule pri prokariontih s hormonskimi molekulami pri evkariontih (Tomasz *in sod.*, 1965). Sporazumevanje med prokarionti so dokazali pri zelo različnih skupinah mikroorganizmov (Dworkin, 1991). Izkazalo se je, da gram-negativne bakterije velikokrat uporabljajo peptide in homo-serin-laktone signalne molekule, gram-pozitivne pa v glavnem signalne molekule peptidnega izvora (Dunny in Winans, 1999).

Zaznavanje celične gostote ali QS (*ang. quorum sensing*, izraz, ki so ga uvedli Fuqua *in sod.*, 1994) je nadzorovano z zunajceličnimi signali (*ang. quormons*). Mehanizmi delovanja signalnih molekul so zelo različni: difuzija, transdukcija in aktivni vnos. Včasih lahko ena signalna molekula spodbudi več različnih odgovorov. Transdukcija signalne molekule preko membrane poteka z dvokomponentnim sistemom ali pa se po prehodu v celico veže na znotrajcelični efektor. Gram-pozitivne in gram-negativne bakterije uporabljajo QS za komunikacijo in regulacijo različnih fizioloških aktivnosti: gibanja, virulence, kompeticije, konjugacije, tvorbe antibiotikov, sporulacije, tvorbe biofilmov in nekaterih simbioz. V zadnjem desetletju veliko proučujejo molekularne mehanizme QS, posebej tiste, ki so neposredno povezani z boleznimi človeka in živali, pridelavo zdravil, prehrabnih artiklov in drugih za človeka uporabnih produktov. Bakterije z zaznavanjem lastne gostote igrajo ključno vlogo v globalni ekologiji (Dunny in Winans, 1999).

Fuqua *in sod.* (2001) obravnavajo QS kot primer skupinskega vedenja, zmožnost mikroorganizmov, da zaznajo količino izločenih difuznih signalnih molekul in se tako odzivajo na gostoto mikrobne populacije. Fiziološki procesi, ki jih uravnava QS, so zelo različni in vrstno specifični. Dober primer takega uravnavanja je bioluminiscenca. Edwards (2000) poudarja, da morajo biti mikroorganizmi v naravnih okoljih kos nihanju fizikalnih in kemijskih razmer, kar pomeni, da se pogosto pojavljajo biokemijske in morfološke oblike, različne od oblik v laboratorijskih kulturah. Celica je v takih razmerah morala razviti prefinjene programe genske ekspresije. Miller in Bassler (2001) obravnavata QS kot regulacijo genske ekspresije, ki se pojavi kot odgovor na nestabilnost v gostoti mikrobne populacije.

Bakterije proizvajajo in sproščajo avtoinduktorske molekule (AI), katerih koncentracija se poveča sorazmerno s povečano gostoto celic. Celice zaznajo prag koncentracije AI, kar spremeni ekspresijo nekaterih genov. Zadnja opažanja potrjujejo, da se medcelična komunikacija s pomočjo AI pojavlja znotraj iste vrste in med različnimi vrstami bakterij. Bakterijska AI lahko sproži odgovore v organizmih gostiteljev. Kljub različni naravi kemičnih signalov in mehanizmov prenašanja signalov ter kljub temu, da se ciljni geni razlikujejo, taka komunikacija omogoča bakterijam usklajevati gensko ekspresijo in s tem tudi vedenje celotne populacije. Ta proces daje bakterijam nekatere kvalitete višjih

organizmov. Predvidevamo lahko, da je bil razvoj QS eden od zgodnjih korakov k razvoju večceličnih organizmov (Dunny in Winans, 1999).

Komunikacija med cianobakterijami, kot najštevilnejšimi predstavniki bakterij med fitoplanktonskimi populacijami, še ni dobro raziskana, čeprav obstaja kar nekaj študij, ki nakazujejo možnost sporazumevanja v obliki QS med cianobakterijami. Nekaj sem jih opisala v podpoglavju 2.3.1 Interakcije med fitoplanktonskimi organizmi. Oprijemljiv dokaz na nivoju ekspresije genov v mutanti *Microcystis aeruginosa* prihaja iz Nemčije. Dittmann in Erhard (2001) sta dokazala homologijo gena in proteina z bakterijo *Rhizobium leguminosarum*, ki ima *rhiABC* operon, ta pa je pod nadzorom QS. Cianobakterijski gen *mrpA* (ang. *microcystin related protein*) je homologen z *rhiB* in njegov produkt, protein MrpA, z RhiA, kar kaže na možno prisotnost sistema QS pri vrsti *M. aeruginosa*.

Bakterijska medcelična komunikacija s pomočjo QS omogoča enoten odgovor bakterijske populacije, kar predstavlja preživetveno prednost, saj omogoči dostop do hranil ali sicer nedostopnih okoljskih niš. QS omogoča združeno obrambo proti ostalim kompetitivnim organizmom ali evkariotskim obrambnim mehanizmom in optimizacijo preživetja populacije z diferenciacijo v morfološke oblike, ki so najbolj prilagojene na trenutne razmere v okolju (Swift *in sod.*, 2001). Bakterije so zmožne sporočiti svojo prisotnost ostalim v okolju s pomočjo QS (Zavilgelski in Manukhov, 2001; Goldberg, 2000). QS je samo eden izmed številnih poznanih bakterijskih sistemov zaznavanja. V veliko sistemih je tvorba signalnih molekul odvisna od faze rasti. Individualna bakterijska celica ima možnost koordinacije lastne genske ekspresije, kjer se uporabljajo faktorji sigma, antisigma in drugi globalni proteinski odzivni regulatorji. Celice lahko začutijo spremembe v okolju in to informacijo povežejo z metilacijo in fosforilacijo določenih metabolnih poti. Zmožne so tvorbe površinskih ali eksportiranih proteinov, ki lahko služijo za vezavo z drugimi, celo evkariontskimi celicami.

Morda je sistem z AI edinstven in zagotavlja nizko energijski mehanizem, s katerim celice signalizirajo na razdalje. V naravnih okoljih so akumulacije AI bolj verjetne kot možnost neposrednega medceličnega kontakta. AI so učinkovit način pospeševanja bakterijske enotnosti v povezavi z izražanjem genov. Prisotnost AI v okolju izzove tudi odgovor drugih bakterij in evkariontskih celic; tako pride do komunikacije. Raziskave na tem področju bi morale težiti k proučevanju na ekološki in populacijski ravni, saj le tako lahko ocenimo vlogo in pomembnost neke signalne molekule v celotni združbi. Lep primer za to je srpasta anemija, ki je proučevana na celičnem nivoju veljala za pomanjkljivost, na populacijskem nivoju pa se je v področjih z malarijo izkazala kot velika prednost (Dunphy *in sod.*, 1997).

## 2.4 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI CIANOBAKTERIJ

### 2.4.1 Biološko aktivne snovi

Biološko aktivna snov je v splošnem endogena snov, ki jo organizem proizvaja ali potrebuje. Ena skupina biološko aktivnih snovi so tudi toksini. Toksin je snov, ki jo proizvede živ organizem (bakterija, rastlina ali žival) in povzroči poškodbo ali poslabšanje zdravja živega organizma s kontaktom ali absorbcijo, ponavadi s sodelovanjem bioloških makromolekul kot so encimi in receptorji (Whittles in Goldie, 1993). Beseda toksin se uporablja pretežno za snovi naravnega izvora, ki delujejo hitro v majhnih koncentracijah kot npr. bakterijski proteini, ki povzročajo tetanus in botulizem. Beseda toksičen (strupen) se uporablja tudi širše npr. za nebiološki material, »toksični odpadki« in »toksikologija«.

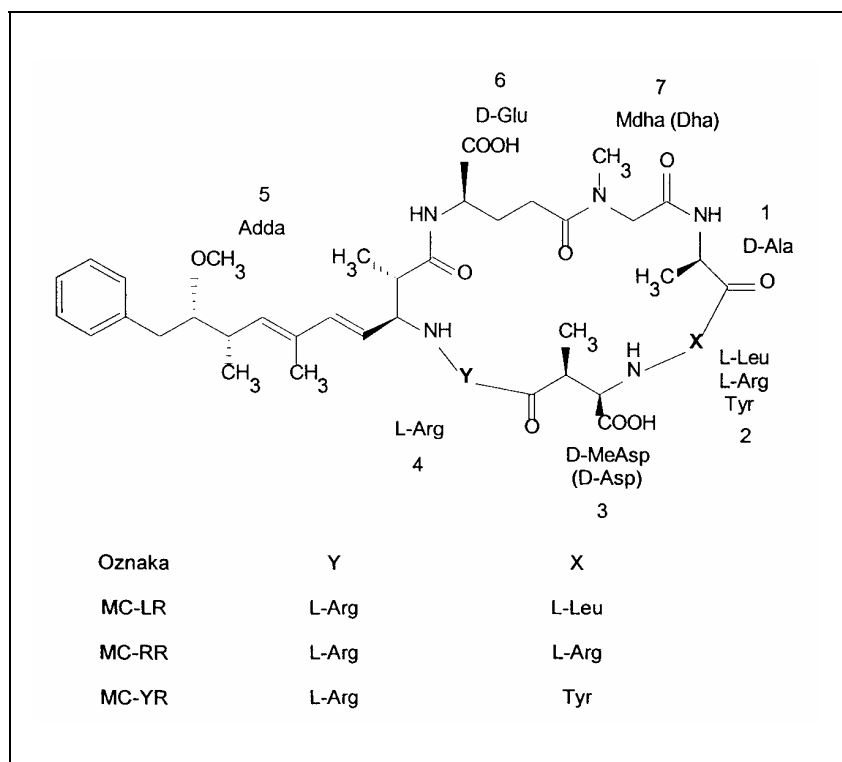
Cianobakterije kot tudi ostali fitoplanktonski organizmi v vrsti različnih bioloških aktivnosti proizvajajo množico različnih snovi. Med vsemi so za ljudi zelo pomembni hepatotoksini, kot so MC, in nodularini ter nevrotoksini, kot sta anatoksin in saksitoksin. Cianobakterijske snovi, kot so 9-deazaadenosine, dolastatin 13 in analogi, izražajo citotoksičnost za tumorske celice. Mnogo snovi iz cianobakterij je inhibitorjev proteaz in drugih encimov: mikopeptini, cianopeptolini, oscilapeptini, mikroviridin, aeruginozini. V splošnem so najbolj pogosti strukturni tipi ciklični peptidi, ciklični peptidi z ureido vezjo in depsipeptidi, najdemo pa tudi druge tipe: linearne peptide, guanidine, fosfonate, purine in makrolide (Namikoshi in Rinehart, 1996). Velika večina snovi, ki jih proizvajajo cianobakterije, najbrž še ni opisana in/ali določena, vendar se število na novo opisanih snovi povečuje iz dneva v dan.

### 2.4.2 Mikrocistini

Mikrocistine (MC) uvrščajo med sekundarne metabolite, ki jih proizvajajo toksične cianobakterije (Carmichael, 1994). Kubo *in sod.* leta 2004 poročajo že o več kot 70 strukturnih homologih mikrocistinov. V zadnjih letih število strukturno podobnih homologov še narašča. Skupaj z Grach-Pogrebinsky *in sod.* (2004) smo iz cveta *Planktothrix rubescens* iz Blejskega jezera izolirali dva nova homologa mikrocistinov: seco[D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR in [D-Asp<sup>3</sup>, D-Glu(oMe)<sup>6</sup>]MC-RR, skupaj z že znano varianto [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR.

#### 2.4.2.1 Struktura

Strukturo novih homologov MC se večinoma določa s pomočjo 2D nuklearne magnetne resonance (NMR), masne spektroskopije visoke ločljivosti (MS) in kemijskih tehnik (Grach-Pogrebinsky *in sod.*, 2004). MC so monociklični heptapeptidi (Slika 3), ki imajo na nekaterih mestih spremenljive aminokislino, vsebujejo tudi neobičajne aminokislino in značilno aminokislino Adda, ki ima pomembno vlogo pri toksičnosti molekule. Drugačna stereokemija zaradi konjugirane dvojne vezi v tej aminokislini se lahko izrazi v izgubi toksičnosti (Dawson, 1998). Zelo pogosto opisani člani družine MC so: MC-LR (L in R označujeta 2 spremenljivi aminokislini, v tem primeru L-levcin in L-arginin), MC-RR (z L-argininom na obeh spremenljivih mestih) in MC-YR (z L-argininom in tirozinom) (Dawson, 1998).



Slika 3: Struktura najpogostejših mikrocinov (povzeto po Dawson, 1998).

#### 2.4.2.2 Sinteza

MC so v celici predvsem v predelu tilakoid in nukleoida. To je verjetno tudi predel njihove sinteze. O vlogi ekstrakromosomskih elementov DNK (plazmidov) pri sintezi toksina se v znanstvenih krogih še razpravlja (Carmichael in Falconer, 1993). Da bi določili mesto, kjer so molekule MC-LR v celicah cianobakterij, so uporabljali z zlatom konjugirana poliklonska protitelesa proti MC-LR (Shi *in sod.*, 1995).

Nekatere molekule MC najdemo tudi v membrani. Hidrofobni ostanek aminokislina Adda naj bi omogočil zasidranje molekule MC v membrano, polarni peptidni obroč pa naj bi vezal kovine v citoplazmi, kar nakazuje funkcijo transmembranskega prenašalca. Dokazano je namreč, da MC-LR veže  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{2+}$  in ima ionoforne lastnosti (Orr in Jones, 1998).

MC se sintetizirajo neribosomsko z multifunkcionalnim encimskim kompleksom, ki ga sestavljajo: peptidna sintetaza, poliketidna sintetaza in zaključni encimski modul, ki ga kodira skupina genov *mcyA-J* (Marahiel *in sod.*, 1997; von Döhren *in sod.*, 1997). Filogenetske analize potrjujejo zgodnjo sočasno evolucijo teh genov. Biosinteza MC vključuje vsaj 48 posameznih reakcij. V cianobakteriji *M. aeruginosa* PCC7806 na ekspresijo genov *mcy* vpliva intenziteta svetlobe in celična gostota. Poleg tega so dokazali tudi transkripcijo genov *mcy*, ki je odvisna od koncentracije MC in ekspresijo proteina *McyF*, ki je potreben za biosintezo MC. Rezultati nakazujejo, da MC na nek način nadzorujejo lastno ekspresijo. Podoben pojav najdemo pri večini opisanih bakterijskih komunikacij z AI v sistemu QS, zato sklepajo, da bi bil tudi MC lahko vključen v sistem QS. Kot dokaz zgornji trditvi so s pomočjo 2-D elektroforeze primerjali različne proteinske

frakcije iz divjih sevov in mutant z in brez dodatka MC-LR. Ob minimalnem dodatku MC-LR so odkrili protein *MrpY* (ang. *microcystin related protein*), ki se je znotraj celic in je verjetno odgovoren za prenos signala s celičnega receptorja do skupine genov *mcy*, kjer leži tudi gen *mrpY* (Dittmann *in sod.*, 2004).

#### 2.4.2.3 Mikrocistini in dejavniki okolja

Razumeti, kako dejavniki okolja vplivajo na sintezo cikličnih peptidov v cianobakterijah, je izziv za raziskovalce že več kot 50 let. Veliko študij se ukvarja s posameznimi dejavniki, kot so: temperatura, svetloba, hranila, kot sta fosfor in dušik ter elementi v sledovih. Vsem je skupna le spremenljivost odgovorov na nek dražljaj. Edina kvantitativna razlaga za to spremenljivost je, da je vse to povezano s celičnim ciklom cianobakterij. Med delitvijo celic in sintezo MC obstaja neposredna linearna povezava. Hranila, svetloba, temperatura in drugi dejavniki, ki vplivajo na rast, vplivajo preko delovanja na celično delitev tudi na sintezo MC v cianobakterijah, vendar ne neposredno preko sinteze ali razgradnje MC (Orr in Jones, 1998).

Dejavniki, ki so pomembni za nastanek cianobakterijskega cveta (npr. koncentracije hranil, temperatura vode, svetloba, veter...), so pomembni tudi za sintezo toksinov, čeprav mehanizem še ni poznan. Koncentracija hepatotoksinov v cianobakterijah je v tesni soodvisnosti s primarno produkcijo na enoto klorofila, s svetlobo, s površinsko temperaturo vode, z vrednostmi pH in koncentracijo kisika (Kotak *in sod.*, 1993).

#### 2.4.2.4 Stabilnost, razpad in razgradnja

Mikrocistini so kemijsko relativno stabilni, a podvrženi intenzivni biološki razgradnji v stoječih vodnih telesih (Jones *in sod.*, 1995). Ponavadi se beseda "razpad" nanaša na abiotski razcep medtem ko beseda "razgradnja" ponazarja biološki razcep toksinov. Zmanjšanje koncentracije MC v naravi ni vedno posledica razpada in razgradnje. Najpogosteje gre za preplet biološke razgradnje in več različnih kemijskih procesov (razpad). Lahko pride do razredčitve (Horda in Tsuji, 1998), fotolize (Jones *in sod.*, 1995; Horda in Tsuji, 1998), termalne dekompozicije zaradi sprememb v temperaturi in vrednosti pH (Horda in Tsuji, 1998; Feitz in Waite, 1999) in/ali adsorbcije na glinene delce (Horda in Tsuji, 1998; Morris, 2000). Ugotovili so, da se na glinene delce lahko veže tudi do 81% MC-LR (Morris, 2000). Za razliko od glinenih tal plasti proda ne zadržijo cikličnih peptidov cianobakterij. MC potujejo skozi plasti proda, vendar počasneje kot same celice cianobakterije *Microcystis aeruginosa* (Bricelj in Sedmak, 2001).

Po razpadu cianobakterijskih celic se MC sprostijo v vodo. Že v mukusu celic *M. aeruginosa* so včasih heterotrofne bakterije, ki lahko dokaj hitro razgrajujejo MC, odvisno od razmer v okolju in navzočih bakterijskih vrst. Biološka bakterijska razgradnja naj bi potekala s spremembo Adda stranske verige (Watanabe *in sod.*, 1992). Kolonije *M. aeruginosa* obdaja polisaharidna ovojnica, ki varuje celice pred izsušitvijo in poškodbami. Tako so tudi MC obvarovani pred razgradnjo (Jones *in sod.*, 1995). Obstajajo tudi novejši dokazi, da razgradnja v naravnem okolju poteka predvsem biološko: večji del v sedimentu, manjši del v vodnem stolpcu (Ishii in Abe, 2000). Biotransformacija MC v



organizmu poteka s pretvorbo v bolj polarno obliko, npr. s pomočjo glutation S-transferaze, ki poveže MC z glutationom.

Očiščeni MC so kemijsko stabilni, čeprav lahko pod vplivom sončne svetlobe pride do izomerizacije dvojne vezi v Adda. Razpolovna doba MC je 10 dni. Še bolj pa razpadajo v območju svetlobe UV, kjer MC najbolj absorbirajo svetlobo (238-254 nm) (Tsuji *in sod.*, 1995). Fotokatalitična razgradnja v naravnem okolju poteka zelo hitro pri zelo nizkih vrednostih pH in s TiO<sub>2</sub> kot katalizatorjem (Feitz in Waite, 1999). Stabilnost MC v laboratorijskih poskusih je pri nizkih koncentracijah MC (1 µg/ml) omejena na manj kot 1 teden. V deionizirani vodi je MC stabilen 27 dni, v sterilizirani vodi pa več kot 12 dni (Cousins *in sod.*, 1996). MC-LR po fotokemičnem razklopu na sončni svetlobi razpade na netoksične derivate. V dveh tednih razpade več kot 90% toksina, ob prisotnosti fotosinteznih pigmentov je ta proces še hitrejši (Tsuji *in sod.*, 1994).

#### 2.4.2.5 Učinki mikrocistinov na evkariontske celice

MC v evkariontskih celicah deluje kot inhibitor proteinskih fosfatov 1 in 2A (MacKintosh *in sod.*, 1990). Na proteinske fosfataze se MC vežejo z nanomolarno ali še nižjo inhibicijsko konstanto (Dawson, 1998). Fosfataze 1 in 2A neposredno vplivajo na delovanje proteinske kinaze C, ki je osrednjega pomena za uravnavanje aktivnosti proteinov v celici (Cohen P in Cohen PTW, 1989). Tudi nedavno izolirana homologa MC: seco[D-Asp<sup>3</sup>]MC-RR in [D-Asp<sup>3</sup>, D-Glu(oMe)<sup>6</sup>]MC-RR kažeta šibko inhibitorno aktivnost za proteinsko fosfatazo 1 (Grach-Pogrebinsky *in sod.*, 2004).

Potrjeno je tudi, da MC delujejo kot tumorski promotorji. Možno je, da sodelujejo pri nastanku rakastih celic, prav gotovo pa že prisotne rakaste celice spodbujajo k hitrejši delitvi oz. povzročijo razvoj nadaljnjih sprememb (Falconer, 1994; Carmichael, 1994). Dokazano je, da MC-LR inducira oksidativne poškodbe deoksiribonukleinske kisline (DNK) v človeški jetrni celični liniji HepG2. Ugotovili so, da koncentracije MC-LR od 0,01 do 1 µg/ml, ki sicer niso citotoksične, izzovejo prekinitve v DNK celične linije HepG2. Poškodbe so bile največje 4 ure po dodatku. MC-LR namreč sproži nastanek reaktivnih vrst kisika, kar posredno povzroči poškodbe DNK. Na ta način lahko MC-LR pripomore k nastanku raka na jetrih (Žegura *in sod.*, 2003). Lankoff *in sod.* (2004) so proučevali vpliv MC-LR na poškodbe DNK v človeških limfocitih. MC-LR v koncentracijah 1,10 in 25 µg/ml ni imel vpliva na frekvenco poškodb kromosomov v limfocitih. Njihovi rezultati nakazujejo, da so poškodbe DNK povezane z zgodnjimi stadiji apoptoze. Menijo, da gre za citotoksične in ne genotoksične vplive MC-LR. Ugotovili so tudi, da ima MC-LR inhibitorne vplive na popravljalne mehanizme, ki se vključijo po ionizirajočem obsevanju celic.

MC poleg zgoraj opisanega delovanja vplivajo tudi na druge procese v celici. Dawson (1998) poroča o povišani koncentraciji citoplazemskega Ca<sup>2+</sup>, zmanjšani fluidnosti membrane in stimulaciji nastanka prostoglandinov. Zastrupitev z MC-LR ali MC-YR sproži spremembe citoskeleta, apoptozo in nekrozo jetrnih celic. Poleg sprememb v jetrih, je opaziti tudi poškodbe v ledvicah. To so ugotovili s poskusi na podganah, ki so jim intraperitonealno vbrizgavali MC-LR ali MC-YR v koncentraciji 10 µg MC/kg. Patološke spremembe zaradi MC-LR so bile hujše od tistih zaradi MC-YR (Milutinović *in sod.*, 2003). MC-LR vpliva na citoskelet in morfologijo *in vitro* celičnih linij kunčjih zarodkov.

Visoke koncentracije MC-LR (100  $\mu\text{M}$ ) so povzročile uničenje celic, medtem ko so nizke koncentracije (10-20  $\mu\text{M}$ ) vplivale na organizacijo mikrotubulov in aktinskih filamentov (Frangž *in sod.* 2003).

Proučevali so tudi učinke MC-LR in okadaične kisline na fosforilacijo in ATP-azno aktivnost  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  črpalke v škrgah rib. MC-LR in okadaična kislina ne blokirata samo hidrolize fosforiliranih proteinov ampak tudi inhibirata defosforilacijo encimov črpalke. Ta inaktivacija poruši homeostazo ionov, ki je potrebna za pravilno delovanje celic (Zambrano in Canelo, 1996). Znano je namreč, da je delovanje okadaične kisline podobno delovanju MC: oba sta inhibitorja proteinskih fosfatov 1 in 2A (Mellgren *in sod.*, 1995).

Ne samo MC, temveč tudi ostale snovi v cianobakterijskem cvetu lahko povzročijo poškodbe jeter in ledvic. Tako so najboljše proučeni MC skupaj z ostalimi snovmi iz cianobakterijskega cveta dobili novo razsežnost: poleg že znanega vpliva na tvorbo tumorjev (Sedmak in Šuput, 2002), ekstrakti iz toksičnih cianobakterij sprožijo poškodbe deoksiribonukleinskih kislin *in vitro* in *in vivo* (Šuput *in sod.*, 2002).

Obstajajo tudi dokazi o vplivu MC-LR na celične linije, kot so HeLa, KB ipd. Dokazali so, da MC-LR lahko poškoduje njihovo membrano, kar je v prid hipotezi o funkciji MC-LR kot ionofora (Chong *in sod.*, 2000).

#### 2.4.2.6 Vpliv mikrocinov na živali in ljudi

MC vplivajo na zooplankton in nekatere žuželke. Vsebnost MC zaščiti cianobakterije pred napadom nekaterih plenilcev. Zanimiva je ugotovitev, da se zooplankton hrani s proizvajalci MC le izjemoma in še to v koncentracijah, ki ne povzročajo njihovega pogina (Carmichael, 1994).

MC so toksični za sesalce in višje rastline. Toksičnost teh snovi se raziskuje in ocenjuje s pomočjo živalskih modelov. V nekaterih primerih je poznan tudi biokemijski mehanizem in celotno toksično delovanje na določene organe (Carmichael in Falconer, 1993). Učinek toksičnosti na določen organizem je odvisen od količine in koncentracije toksina ter razmer v okolju (Sedmak in Kosi, 1998). Laboratorijski poskusi z MC-LR so pokazali, da smrtni odmerek, pri katerem pogine 50 odstotkov poskusnih živali ( $\text{LD}_{50}$ ), znaša za miši in podgane 36-122  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , odvisno od načina vnosa (vključno z vdihavanjem aerosolov). Na poskusnih živalih so opazovali čas od inokulacije do pogina, količino toksina na kilogram telesne teže in način inokulacije. Opazili so predvsem spremembo jeter - sprememba barve, povečana teža, ipd. (Dawson, 1998).

Pri ljudeh, ki so bili izpostavljeni toksičnim cvetenjem cianobakterij, so pogosto ugotovili alergijske reakcije, gastroenteritis in/ali jetrne bolezni (hepatotoksikoze). Cianobakterije običajno pridejo v telo skozi usta. Zaradi prebave v želodcu se iz celic sproščajo MC, potujejo po krvnem obtoku in s pomočjo prenašalcev žolčnih kislin aktivno prehajajo skozi membrane jetrnih celic. Ni znano, da bi MC pasivno prehajali skozi membrane evkariontskih celic. Najbolj učinkoviti antagonisti toksičnega delovanja MC so antibiotik rifampin in poliklonska protitelesa. MC po vstopu v evkariontske celice inhibirajo serin-treoninske proteinske fosfataze 1 in 2A (Dawson, 1998). Subkronično zastrupitev z MC so raziskovali tudi v tkivu jeter kuncev. Histološke analize so pokazale, da so morfološke

spremembe, vidne z magnetno resonanco, podobne poškodbam, ki so značilne za maščobno infiltracijo in periportalno fibrozo (Frangež *in sod.*, 2000).

Ugotovljena in dokazana je toksičnost MC-LR za ptice in sesalce (Dawson, 1998), žabe (Fischer in Dietrich, 2000) in ribe (Vajcova *in sod.*, 1998; Navratil, 1998). Zanimivo je, da MC-LR pri intraperitonealnem vnosu vpliva toksično na jetra rib, pri oralni aplikaciji pa vpliva toksično tudi na eritrocite in deluje na encime v plazmi, vendar samo, kadar aplikacija vsebuje tudi ustrezno biomaso toksičnih cianobakterij (Navratil, 1998). Sicer pa so povišane aktivnosti encimov, kot so alanin- in aspartat-aminotransferaza ter laktat-dehidrogenaza, v plazmi posledica intraperitonealno vbrizganega MC-LR (Malbrouck *in sod.*, 2003). Zaradi prisotnosti MC pride tudi do povečanja vsebnosti sorbitol- in laktat-dehidrogenaze v serumu (Dawson, 1998).

V raziskavah, kjer so se osredotočili na tumorje jeter pri mladih prašičih, so ugotovili, da je 1,0 µg toksina na liter vode še varna količina dnevno zaužitega toksina (~5000 celic cianobakterij/ml). Za človeka po preračunu znaša količina 0,28 µg toksina/kg/dan (Falconer, 1994). Glede na priporočila svetovne zdravstvene organizacije (WHO) najvišja dopustna koncentracija v pitni vodi znaša 1 µg ekvivalentov toksina MC-LR/l (Falconer, 1999). Seveda gre le za oceno tveganja. Zanesljivost ocene je odvisna od vzorčenja in analitičnega pristopa k obdelavi vzorca (Falconer, 1994).

#### 2.4.2.7 Vpliv mikrocinov na fitoplanktonske organizme in njihova ekološka vloga

Večina toksikoloških študij za MC se omejuje na vodne živali in rastline, le nekaj jih proučuje vplive MC na fitoplankton. Velik ekološki pomen pripisujejo vplivu MC na različne seve cianobakterij. Tako na tiste seve, ki MC proizvajajo, kakor tudi na seve cianobakterij, ki MC ne proizvajajo, saj vplivajo na njihovo delitev in biomaso (Sedmak in Kosi, 1998; Batagelj, 2000; Dragan, 1998). Sicer pa prisotnost visokih koncentracij MC v cianobakterijskem cvetu dodatno vpliva na zmanjšanje biotske pestrosti. Cvetovi z visoko koncentracijo hepatotoksičnih cikličnih peptidov dosežejo višje celične gostote, kar se ujema tudi z vsebnostmi MC v celicah (Sedmak in Kosi, 2002). *In vitro* poskusi so pokazali, da MC vpliva na razmnoževanje fitoplanktonskih organizmov. Ta vpliv je zelo odvisen od vrste testiranega fitoplanktona in svetlobnih razmer (Sedmak in Kosi, 1998). Vpliv MC na sintezo klorofila in fotosintezno aktivnost smo dokazali tudi pri zeleni algi *S. quadricauda* (Eleršek, 2001). Po mnenju nekaterih so fitoplanktonske vrste, kot npr. *S. quadricauda*, zelo dober kazalec dlje časa trajajočih neugodnih fizikalno-kemijskih razmer, saj ima večina fitoplanktonskih vrst izdelano strategijo preživetja stresnih obdobj. Kljub dejstvu, da imajo cianobakterije nižjo maksimalno rast kot večina fitoplanktonskih vrst, so v določenih razmerah zmožne prerasti druge vrste v cvetu. Dokazano je, da ima MC-RR pri nizkih intenzitetah svetlobe na fitoplankton različne vplive: od povečanja do zaviranja delitve celic in celo zmanjšanja števila celic. Ti vplivi so močno odvisni od točno določenih razmer, predvsem svetlobe. Čeprav so koncentracije MC v vodnem okolju ponavadi nizke, ne smemo pozabiti na mikrokoolja, kjer so lahko koncentracije relativno visoke. Po odmrtnosti cianobakterijskega cveta pogosto postanejo dominantne zelene alge. Nekateri avtorji to pripisujejo uspešnemu izkoriščanju svetlobnih razmer in navzočim MC (Sedmak in Kosi, 1998).

Merjenje koncentracij klorofila *a* kot odgovor celice na stres se je izkazalo za zelo uporabno, saj se koncentracija tega glavnega fotosinteznega pigmenta spremeni relativno hitro kot odgovor na spremembo svetlobe, temperature, hranil in celo kot odgovor na hitrost in stopnjo turbulentnosti vodnega toka (Hondzo in Lyn, 1999). Kot odgovor na toksične ione v vodi ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), kar za celice predstavlja stres, se količina klorofila *a* v celicah *S. quadricauda* zmanjša (Fargasova, 1998, 1999; Kuepper H in Kuepper F, 1998; Rojickova in Marsalek, 1999). Enako se zgodi pri onesnaževanju s herbicidi (Fargasova, 1998) in nafto (Tukaj *in sod.*, 1998). Ioni kovin se z veliko afiniteto vežejo na sredino polarnega obroča molekule MC in tako zagotavljajo stabilno strukturo molekule (Yan *in sod.*, 2000). Zanimivo je, da se ob dodatku ionov železa v koncentraciji 10 mg/l, količina klorofila *a* v celicah *S. quadricauda* zelo poveča: celotni klorofil v celici se poveča do 80 % (Fargasova, 1999). Nekatere hipoteze zagovarjajo, da pomanjkanje nekega elementa sicer stresno deluje na celice, vendar deluje pozitivno na tvorbo MC. Tako lahko celice ob pomanjkanju železa izdelajo druge proteine, tudi MC. Ti naj bi bili sposobni opravljati naloge proteinov, ki so zaradi stresa propadli. Po mnenju nekaterih znanstvenikov je tvorba MC lahko odgovor na specifične stresne razmere v okolju (Lukač in Aegerter, 1992).

Rezultati poskusov s poliklonskimi telesi in MC nakazujejo, da so inhibitorji proteinskih fosfatov pri avtotrofnih povezani s fotosintezno aktivnostjo (Shi *in sod.*, 1995). Abe *in sod.* (1996) so pokazali, da MC-LR inhibira fotosintezo fižola (*Phaseolus vulgaris*). Metaboliti cianobakterij so velikokrat usmerjeni proti fotosintezi cianobakterij, alg in višjih rastlin (Smith in Doan, 1999). Čeprav MC v splošnem delujejo tudi na cianobakterije, so dokazali, da MC-LR ne vpliva na katalitično aktivnost cianobakterijskih proteinskih fosfatov PP1-cyano1 in PP2-cyano2, ki spadata v družino serin-treoninskih fosfatov (Shi *in sod.*, 1999). Delovanje MC je podobno delovanju okadaične kisline, ki je prav tako inhibitor proteinskih fosfatov 1 in 2A. Okadaično kislino so našli le v kloroplastih dinoflagelatov (Zhon in Fritz, 1994).

Hu *in sod.* (2004) so testirali biološke parametre enocelične cianobakterije *Synechococcus elongatus* ob izpostavljenosti MC-RR. Ugotovili so, da koncentracije MC-RR nad 100  $\mu\text{g/l}$  značilno inhibirajo rast in delitev *S. elongatus*. Poleg tega je prišlo do zmanjšane sinteze klorofila *a* in fikocianinov ter do sprememb v barvi (kloroza) obdelanih kultur. Veliko zmanjšanje razmerja Fv/Fm priča o zmanjšanem fotokemijskem izkoristku FSII. Prišlo je tudi do sprememb v vsebnosti proteinov, ogljikovih hidratov in aktivnosti nitratne reduktaze. Kot vidimo gre za vpliv MC na fiziološke in biokemijske procese v testirani cianobakteriji.

Aktivnost MC-LR so potrdili tudi Singh *in sod.* (2001). Iz cveta cianobakterije *Microcystis aeruginosa* so izolirali MC-LR in ga v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M dodajali kulturam zelenih alg, cianobakterij, heterotrofnih bakterij in gliv. Ugotovili so, da MC-LR nima vpliva na bakterije in glive, inhibira pa rast in delitev zelenih alg in cianobakterij (*Nostoc*, *Anabaena*). Poleg tega pri izbranih fitoplanktonih zmanjša izločanje  $\text{O}_2$  in prevzem  $\text{CO}_2$  ter zmanjša aktivnost nitrogenaze. Poskusi z označenim  $^{14}\text{C}$  MC kažejo, da se prevzem toksina v cianobakterijsko celico dogaja na svetlobi in v temi.

Novejša odkritja potrjujejo vlogo MC kot znotraj-celične signalne molekule (Dittmann *in sod.*, 2004). Poleg že omenjenih hipotez o možni vlogi MC kot signalnih molekul in

obrambnih snovi, obstajajo tudi mnoge druge hipoteze. Kljub številnim podatkom, je le malo znanega o resničnih razlogih za obstoj in sintezo tega biološko aktivnega cikličnega peptida.

### 2.4.3 Planktopeptini in anabaenopeptini

Cianobakterije izdelujejo številne sekundarne metabolite, ki niso udeleženi v primarnem metabolizmu (Carmichael, 1992). Poleg že prej opisanih MC, sta zelo zanimivi skupini depsipeptidov in cikličnih peptidov z ureido vezjo. Oboji so cianobakterijski ciklični peptidi z molsko maso okrog 1000 in z neobičajnimi lastnostmi (Grach-Pogrebinsky *in sod.*, 2003). Poznamo številne snovi iz cianobakterij, ki inhibirajo proteaze: mikropeptine, cianopeptoline, oscilapeptin, mikroviridin in aerogozin (Namikoshi in Rinehart, 1996).

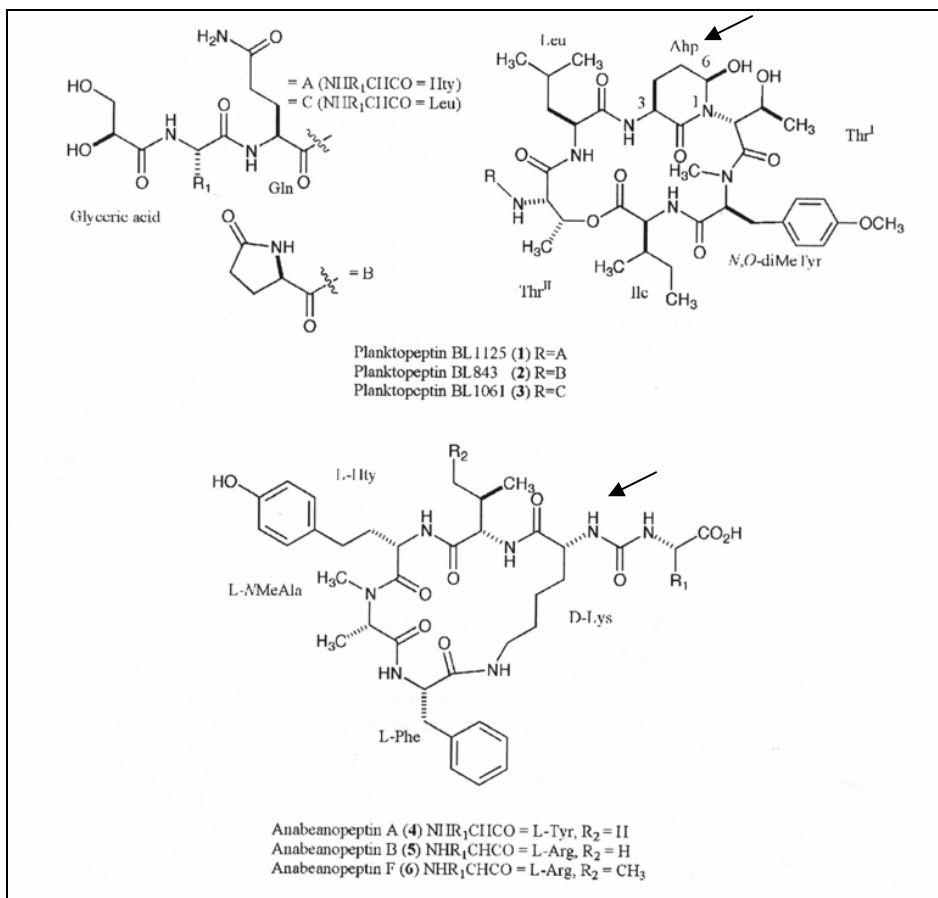
Inhibitorji serinskih proteaz mikropeptinskega tipa so najbolj pogosti proteazni inhibitorji iz cianobakterij, z več kot 50 opisanimi predstavniki (Reshef in Carmeli, 2001). Serinske proteaze so ena izmed bolje proučenih skupin encimov. Selektivna inhibicija proteaz pri človeku je zanimiva predvsem za farmacevtske uporabnosti - od kardiovaskularnih bolezni do raka (McDonough in Schofield, 2003).

Seznama cikličnih depsipeptidov in cikličnih peptidov z ureido vezjo, ki so jih izolirali iz različnih vrst cianobakterij, sta prikazana v Preglednicah 1 in 2. Število novih cikličnih peptidov, ki so jih izolirali iz cianobakterij, se vsak dan povečuje, vendar pa je njihova vloga v okolju zaenkrat še neznanka.

#### 2.4.3.1 Struktura cikličnih depsipeptidov in cikličnih peptidov z ureido vezjo

Ciklični peptidi cianobakterij so si, kot že ime pove, zelo podobni po svoji ciklični strukturi. Na Sliki 4 lahko vidimo strukture treh depsipeptidov in treh anabaenopeptinov. Puščice na sliki označujejo skupino Ahp, ki je značilna za depsipeptide, in ureido vez, ki je značilna za ciklične peptide z ureido vezjo. V našem laboratoriju proučujemo planktopeptin BL 1125 (PP), ki je prikazan pod številko (1) in anabaenopeptin B (AnP B), ki je prikazan pod številko (5).

PP z molekulske formule  $C_{54}H_{79}N_9O_{17}$  je po kemijski definiciji depsipeptid. Ima značilno skupino Ahp, ki šteje za dve aminokislini. AnP je peptid z ureido vezjo, ki se od amidne vezi loči po dodatni skupini  $-NH$ . Molska masa ( $m/z$ ) za PP znaša 1125, za AnP B pa 836. Masa teh oligopeptidov se torej ne razlikuje bistveno od mase MC. Planarno strukturo so določili s pomočjo homonuklearne in inverzne heteronuklearne 2D NMR ter MS visoke ločljivosti (Grach-Pogrebinsky *in sod.*, 2003).



Slika 4: Struktura planktopeptinov in anabaenopeptinov (Grach-Pogrebinsky *in sod.*, 2003).

Zgornja puščica označuje skupino Ahp, ki je značilna za depsipeptide.

Spodnja puščica označuje značilno ureido vez, ki jo najdemo v anabaenopeptinih.

#### 2.4.3.2 Ciklični depsi-peptidi

Cianobakterije proizvajajo različne ciklične depsi-peptide (Preglednica 1). Planktopeptini so nova skupina cikličnih depsi-peptidov, ki smo jih skupaj z izraelskimi znanstveniki izolirali skupaj z že znanimi AnP, in sicer iz cveta cianobakterije *Planktothrix rubescens* iz Blejskega jezera (Grach-Pogrebinsky *in sod.*, 2003). Kot predstavnika depsi-peptidov smo za naše poskuse izbrali planktopeptin BL1125 (PP).

Zanimive so inhibitorne lastnosti cikličnih depsi-peptidov iz *Microcystis* sp.; npr. mikropeptin T-20 inhibira serinsko proteinazo kimotripsin (Harada *in sod.*, 1993). Inhibicijske konstante IC<sub>50</sub> so zelo različne: mikropeptin 90 inhibira plazmin z IC<sub>50</sub> 0,1 µg/ml in tripsin z IC<sub>50</sub> 2,0 µg/ml (Ishida *in sod.*, 1995). Mikropeptin SF909 inhibira tripsin z IC<sub>50</sub> 0,2 µg/ml, mikropeptin SF995 pa z IC<sub>50</sub> 0,5 µg/ml, kar kaže, da sta oba relativno močna inhibitorja serinskih proteaz (Banker in Carmeli, 1999).

Sciptolin A in B iz cianobakterije *Scytonema hofmanni* inhibirata elastazo iz prašičje slinavke z inhibicijsko konstanto IC<sub>50</sub> 3,1 µg/ml (Matern *in sod.*, 2001). Določena je tudi inhibitorna aktivnost depsi-peptidov planktopeptinov iz cianobakterije *Planktothrix rubescens*: PP BL1125 je najmočnejši inhibitor kimotripsina, PP BL 1061 pa najmočnejši inhibitor elastaze (Grach-Pogrebinsky *in sod.*, 2003).

Stevenson *in sod.* (2002) so v morski vodi odkrili depsi-peptid scitonemin, pigment izoliran iz morskih cianobakterij. Scitonemin inhibira različne serin/treoninske kinaze, ki uravnavajo celični cikel. To nakazuje možno vlogo cikličnih peptidov cianobakterij v uravnavanju celičnega cikla.

Preglednica 1: Ciklični depsi-peptidi, ki so jih izolirali iz različnih vrst cianobakterij.

ciklični depsi-peptidi	vrsta cianobakterije	vir
mikropeptin T-20	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Harada <i>in sod.</i> (1993)
mikrocistilid A	<i>Microcystis aeruginosa</i> NO-15-1840	Tsukamoto <i>in sod.</i> (1993)
cianopeptolin	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806	Martin <i>in sod.</i> (1993)
mikropeptin A in B	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Okino <i>in sod.</i> (1993)
mikropeptin 90	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-90	Ishida <i>in sod.</i> (1995)
mikropeptin SF909 in SF995	<i>Microcystis</i> sp.	Banker in Carmeli (1999)
sciptolin A in B	<i>Scytonema hofmanni</i>	Matern <i>in sod.</i> (2001; 2003)
scitonemin	<i>Stigonema</i> sp.	Stevenson <i>in sod.</i> (2002)
planktopeptin BL1125, BL843 in BL1061,	<i>Planktothrix rubescens</i>	Grach-Pogrebinsky <i>in sod.</i> (2003)

### 2.4.3.3 Ciklični peptidi z ureido vezjo

V zadnjih letih število člankov o izolaciji različnih cikličnih peptidov, ki jih izdelujejo cianobakterije, eksponentno narašča. Prevladujejo izolacije MC v kombinaciji z AnP (Preglednica 2). Za naše poskuse smo izbrali AnP B, pogost ciklični peptid z ureido vezjo, za katerega je značilna tudi neobičajna aminokislina homotirozin.

Zanimivo je, da različne vrste cianobakterij kot so *Anabaena flos-aque* (Harada *in sod.*, 1995), *Planktothrix rubescens* (Grach-Pogrebinsky *in sod.*, 2003) in *Planktothrix agardhii* (Murakami *in sod.*, 1997) izdelujejo identično snov - AnP B. Nekateri menijo, da so v ta fenomen lahko vključene bakterije, ki so povezane s kolonijami cianobakterij, vendar poskusi z akseničnimi sevi cianobakterij dokazujejo, da bakterijska flora ni vključena v tvorbo cikličnih peptidov (Okano *in sod.*, 1999).

Ciklični peptid keramamid A (Kobayashi *in sod.*, 1991a) in konbamid (Kobayashi *in sod.*, 1991 b), ki so ju izolirali iz morske spužve *Theonella* sp., sta po strukturi zelo podobna AnP B, kar potrjuje hipotezo, da so za tvorbo teh snovi v spužvi odgovorne simbiotske cianobakterije.

Zanimive so inhibitorne lastnosti izoliranih cikličnih peptidov. Itou *in sod.* (1991) poročajo, da AnP G in H inhibirata karboksipeptidazo A. Harada *in sod.* (1995) poročajo, da AnP A in B nista bila toksična za živali niti nista inhibirala proteinskih fosfataz v testiranih koncentracijah. Murakami *in sod.* (1997) poročajo, da AnP B pri testiranih koncentracijah ni učinkovito inhibiral serinskih proteaz. Tudi v grških celinskih vodnih telesih, kjer prihaja do cvetenja cianobakterij, poročajo o izolaciji MC-RR, -LR, -YR, -LA, demetiliranih različic MC-LR, -RR ter AnP A in B. Celokupna vsebnost MC je bila 40 do 2565 µg/g liofilizirane kulture, AnP pa do 48 µg/g liofilizirane kulture, kar kaže, da vsebnosti AnP v vodnem okolju še zdaleč niso zanemarljive. Kvantitativna in kvalitativna nihanja MC in AnP v vzorcih kažejo, da gre za geografske trende pri prisotnosti cikličnih peptidov. V podobnih geografskih razmerah najdemo namreč podobne kombinacije cikličnih peptidov (Gkelis *in sod.*, 2005).

Preglednica 2: Ciklični peptidi z ureido vezjo, ki so jih izolirali iz različnih vrst cianobakterij.

ciklični peptidi	vrsta cianobakterije	vir
* anabaenopeptin A in B	<i>Anabaena flos-aque</i> .	Harada <i>in sod.</i> (1995)
anabaenopeptin B	<i>Planktothrix agardhii</i>	Murakami <i>in sod.</i> (1997)
* anabaenopeptin B in F	<i>Planktothrix rubescens</i>	Barco <i>in sod.</i> (2004)
* anabaenopeptin A, B in F	<i>Planktothrix rubescens</i>	Grach-Pogrebinsky <i>in sod.</i> (2003; 2004)
* anabaenopeptin A in B	cianobakterijski cvet	Gkelis <i>in sod.</i> (2005)
keramamid A	simbiotske cianobakterije #	Kobayashi <i>in sod.</i> (1991 a)
konbamid	simbiotske cianobakterije #	Kobayashi <i>in sod.</i> (1991 b)

\* izolirali tudi različne mikrocestine

# simbiotske bakterije *Theonelle* sp.



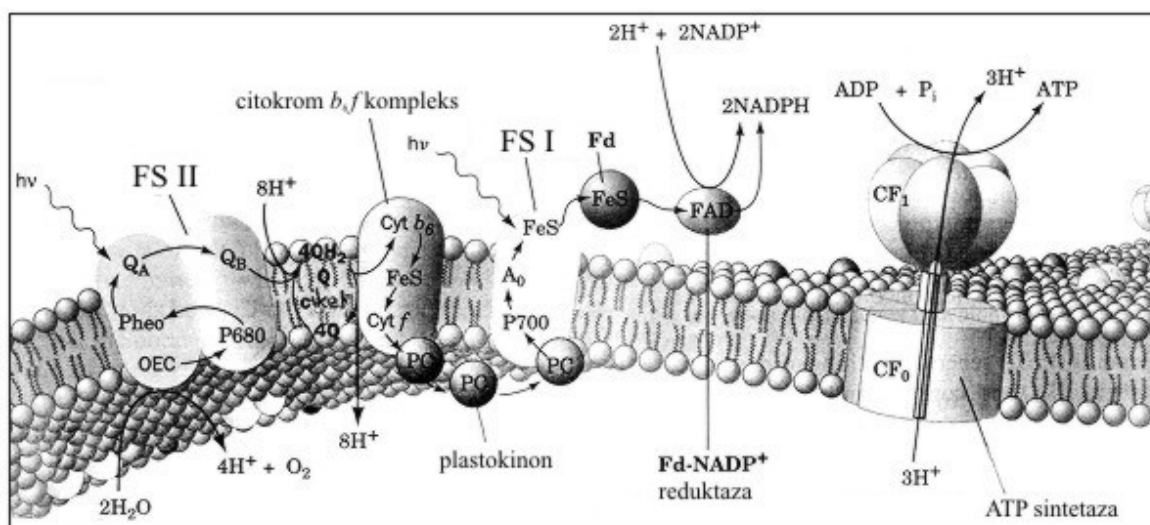
## 2.5 FOTOSINTEZNI APARAT IN MERITVE FLUORESCENCE

### 2.5.1 Mehanizem fotosinteze

Avtotrofni organizmi imajo večinoma Z-tip fotosinteze, kar pomeni, da so fotosintezni elementi v membrani kloroplasta nameščeni v obliki črke Z. Svetloba ima dvojno vlogo: vzbuja fotosinteznih pigmentov in sodelovanje pri fotolizi vode. Absorpcija fotonov oz. svetlobnih kvantov je nadzorovan proces. S fosforilacijo ali defosforilacijo proteinov se spremeni njihova konformacija, kar vodi k premiku antenskih pigmentov, bodisi k fotosistemu I (FS I) bodisi k fotosistemu II (FS II). Fotosintezni pigment se vzbudi s sprejetjem energije svetlobe določene valovne dolžine. Prej šibek oksidant, postane močan reducent, vmes pa oddaja elektrone različnim prenašalcem. Redoks potencial za vsako molekulo oz. kompleks je povezan z njenim oz. njegovim položajem v membrani. Kadar sta oba fotosistema uporabljena eden za drugim, poteka tok elektronov skozi membrano od H<sub>2</sub>O (donor elektronov) do NADP<sup>+</sup> (akceptor elektronov). Ob tem nastaja NADPH, s črpanjem vodikovih protonov pa tudi ATP. Temu procesu pravimo neciklična fosforilacija (Voet D in Voet JG, 1995).

Na začetku elektronske poti (Slika 5) se v FS II kisik iz vode poveže z manganovim kompleksom. S pomočjo štirih fotonov in dveh molekul vode nastane molekula kisika, štiri vodikovi protoni in štiri elektroni. FS II je kompleks molekul v membrani, ki vsebuje: par posebnih klorofilnih molekul, običajen klorofil *a* in *b*, vezan in mobilni kinon. Fotoni svetlobe vzbudijo elektrone; elektroni z visoko energijo potujejo od pigmenta do pigmenta v tem fotosistemu zelo hitro, tako, da se naboj lahko porazdeli. FS II nato odda elektrone reduciranemu kinonu, ki lahko nosi dva elektrona z visoko energijo. Kinon postopoma preda elektrone protonski črpalki, imenovani *citokrom b<sub>6</sub>f kompleks*. Protionska črpalka črpa protone skozi membrano. Nastajajoči elektrokemijski gradient omogoča sintezo ATP na encimskem kompleksu *ATP-sintaze* s fosforilacijo. Elektronski akceptor v tem delu elektronske verige je FS I. Elektroni potujejo, podobno kot v FS II, preko železo-žveplovih centrov in ferodoksina na NADP<sup>+</sup>, da nastane NADPH. V nasprotju z zgoraj opisanimi »svetlobnimi« reakcijami, se v »temnih« reakcijah (tudi del teh mora potekati na svetlobi) veže CO<sub>2</sub> iz zraka. To poteka s Kalvinovim ciklom, ki je povezan z biosintezo različnih sladkorjev (Voet D in Voet JG, 1995).

Glede na velikost ločimo  $\alpha$  in  $\beta$  FS II centre (Masojidek in Torzillo, 1999). Obstajata dve vrsti FS II centrov, in sicer: aktivni, ki prispevajo k redukciji ogljika, in neaktivni, ki ne prispevajo. Ob raziskovanju aktivnosti in heterogenosti FS II so odkrili, da se pri zeleni algi *S. quadricauda* visoka fotosintezna aktivnost ujema z izginotjem neaktivnih centrov FS II in zmanjšanjem velikosti učinkovitih antenskih pigmentov v FS II aktivnih centrih. Zmanjšanje fotosintezne aktivnosti med celično delitvijo se ujema z delnim povečanjem neaktivnih centrov FS II in s pojavljanjem agregatov v tilakoidni membrani. Med periodo minimalne fotosintezne aktivnosti je 30 % centrov FS II neobčutljivih za inhibicijo z inhibitorjem fotosinteze diuronom, bolj znanim pod kratico DCMU, kar bi lahko bilo povezano z reorganizacijo tilakoidne membrane (Meszaros in Kaftan, 1998). Celice se namreč delijo na začetku temne periode (Masojidek in Torzillo, 1999).



Slika 5: Shema fotosinteznega aparata (povzeto po Voet D in Voet JG, 1995: 640).

Maksimalna fotosinteza je pri algi *S. quadricauda* pri  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  med 3. in 5. uro »svetlobne« faze, minimalna fotosinteza pa med celično delitvijo. Razlike med celicami v odgovoru na svetlobo so določili s pomočjo merjenja proizvodnje kisika, emisije fluorescence in termoluminiscence. Razlike pripisujejo heterogenosti FS II in reorganizaciji tilakoidnih membran ter zmožnosti za proteinsko sintezo (Nedbal *in sod.*, 1998).

#### 2.5.1.1 Vpliv svetlobe in fotoprilagoditev

Jakost oz. intenziteta svetlobe je eden od dejavnikov okolja, ki ima velik vpliv na vsebnost pigmentov v mikroalgah. Nekateri fitoplanktonski organizmi so za povečanje stopnje rasti v neoptimalnih razmerah razvili prilagoditve na zelo nizke in na zelo visoke intenzitete svetlobe ( $I_s$ ). Fotoprilagoditev na visoke  $I_s$  služi za omejitev poškodb, ki bi nastale pri veliki osvetljenosti. Presežek absorbirane svetlobe pri fotosintezi je bolj opazen ob znižanju temperature ali pomanjkanju hranil. Fotoprilagoditev mora biti kompromis med največjo stopnjo rasti pri nizki  $I_s$  in najmanjšimi fotooksidativnimi poškodbami zaradi visokih  $I_s$  (Geider in Anning, 1998). Herzig in Dubinsky (1992) poročata, da ob adaptaciji celic na nižje  $I_s$  klorofil na celico naraste 2,3 - 7,4-krat. Fotosintezni aparat se spremeni bodisi s povečanjem velikosti fotosinteznih enot bodisi s povečanjem števila reakcijskih centrov na celico.

Alga *S. quadricauda* ima relativno manjšo občutljivost za fotoinhibicijo FS II in se lažje prilagodi svetlobi visokih intenzitet zaradi učinkovitejšega mehanizma dušenja svetlobe (*ang. quenching*) in velike fotosintezne zmožnosti v primerjavi s sorodnimi fitoplanktonskimi organizmi, npr. algami rodu *Chlorella* (Kaftan *in sod.*, 1999).

## 2.5.2 Fotosinteza in fluorescenca klorofila

Fotosinteza je proces, v katerem potujejo elektroni od vzbujenih molekul klorofila preko vrste elektronskih prenašalcev, ki spreminjajo svetlobno energijo v kemično. Ko neka molekula vsrka svetlobo določene valovne dolžine, preide elektron na višji energijski nivo. Vzbujena molekula se sčasoma vrne v osnovno stanje, energija pa se sprošča v obliki vzbujanja drugih sosednjih molekul, fotooksidacije, emisije fluorescence (le 3-6 % celotne energije) in termičnega razpada oz. sproščanje toplote. V enem fotosinteznem aparatu alg in višjih rastlin je navadno okrog 300 antenskih in precej manj reakcijskih molekul klorofila *a* (Voet D in Voet JG, 1995).

Kljub dejstvu, da je *in vivo* fluorescenca (*F*) klorofila *a* izjemno nizka, nam pove več kot npr. merjenje absorpcije ekstrahiranega klorofila, saj je metoda merjenja *F* manj invazivna in bolj občutljiva. Idejo o obratnem sorazmerju emisije *F* in stopnje fotosinteze nekateri odobravajo, čeprav je še vedno predmet mnogih razprav (Lazar, 1999). Študij *F* klorofila *a* nam lahko pove mnogo o parametrih fotosinteze; mehanizmu prenosa svetlobe, presnavljanju ogljika (fiksacija CO<sub>2</sub>) ipd., saj je *F* neposredno povezana s koncentracijami klorofila *a* (Geider in Osborne, 1992; Papageorgiou, 1996). Merjena *F* izhaja predvsem iz FS II (Schreiber *in sod.*, 1995).

## 2.5.3 Fotosintezne značilnosti vrste *Scenedesmus quadricauda*

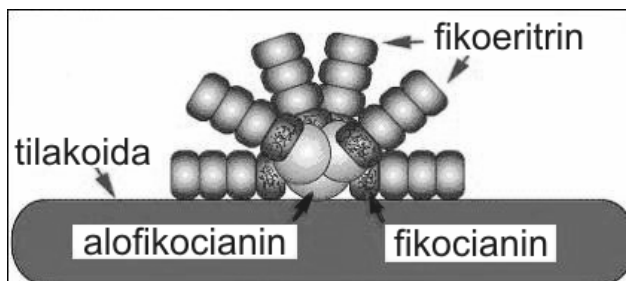
Riznichenko in Lebedeva (1996) sta ugotovila, da imajo cenobiji alge *S. quadricauda* štiri glavne tipe indukcijskih krivulj *F* klorofila, kar ustreza funkcionalni aktivnosti fotosinteznega aparata. V kulturi alg soobstoja več različnih subpopulacij, ki imajo različne stopnje rasti in različne tipe fotosinteznih aktivnosti. Celice aktivnega tipa imajo najvišjo stopnjo rasti, delijo se hitreje kot katerekoli druge celice in zato prevladujejo v eksponentni fazi rasti. Ko gostota celic v kulturi naraste, se poveča motnost in kmalu začne primanjkovati svetlobe. Celice aktivnega tipa postopoma izgubljajo dominantni položaj in struktura populacije se spremeni. Bolje uspevajo celice pasivnega tipa. Obstaja tudi možnost, da gre strukturne prehode v celični populaciji pripisati rekonstrukciji fotosinteznega aparata posameznih celic, kar vodi v spremembo njihove fotosintezne aktivnosti. S tega stališča je videti, da bi moral obstajati mehanizem, ki spreminja fotosintezno aktivnost celic v skladu s stanjem celotne populacije *S. quadricauda*.

## 2.5.4 Fotosintezne značilnosti vrste *Microcystis aeruginosa*

Cianobakterije in rdeče alge za lovljenje svetlobe uporabljajo fikobilisome. To so supramolekularni agregati fikobiliproteinov, ki so vezani na zunanjo stran tilakoidne membrane (Slika 6). Fikobilisomi zbirajo svetlobno energijo in jo skoraj s 100% izkoristkom prenesejo k fotosinteznim reakcijskim centrom FS II in FS I. Fikobilisomi cianobakterije *M. aeruginosa* vsebujejo le pigmента alofikocianin in fikocianin (Raps *in sod.*, 1985).

Vsebnost pigmentov in značilnosti fotosinteznih struktur pri različnih  $I_S$  in se pogosto meri v turbidistatih. Kulture *M. aeruginosa* so pri višjih  $I_S$  rumeno-zelene barve in značilno modro-zelene pri nižjih  $I_S$ . Te spremembe barve so primarno povezane s spremembo razmerja med klorofilom in fikocianini v celici. Zanimivo je, da kljub spremembam  $I_S$

vsebnost vseh karotenoidov ostaja stalna. Prihaja do sprememb na kvalitativnem nivoju karotenoidov, kar je lahko povezano z zaščitno vlogo proti fotooksidaciji klorofila. Pri nižjih  $I_S$  prevladujejo  $\beta$ -karoteni, ehinenon in zeaksantin, pri višjih pa se pojavi še miksoksantofil (Raps *in sod.*, 1983).



Slika 6: Struktura fikobilisoma, ki ga sestavljajo pigmenti fikoeritrin, fikocianin in alofikocianin. Nekateri fikobilisomi, npr. fikobilisomi cianobakterije *Microcystis aeruginosa*, ne vsebujejo fikoeritrina. Fikobilisom potuje na citosolni strani tilakoide med fotosistemoma I in II (povzeto po Httip 1).

Število reakcijskih centrov fotosistema I (FS I) na celico je sorazmerno količini klorofila na celico. Pri svetlobi med 20 in 240  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  FS I vsebuje povprečno 300 molekul klorofila. Razmerje klorofil:FS II (P700) je pri tej svetlobi stalno. Manjša podenota P700 pri visokih  $I_S$  prispeva 40% povečanja razmerja fikocianini:klorofil. Velikost P700 pri višjih  $I_S$  ostaja relativno stalna, medtem ko se število FS I na celico zmanjša. Vsebnost klorofila *a* v celicah *M. aeruginosa* se zmanjša za 3-krat, ko se celice prilagodijo iz nizkih na visoke  $I_S$ . Nad 40  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  je zmanjševanje vsebnosti pigmentov logaritemska funkcija  $I_S$ . Pod 40  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  celice postanejo rahlo razbarvane (Raps *in sod.*, 1983). Rezultate takih poskusov je težko ekološko interpretirati, saj ne vemo, koliko reakcijskih centrov je aktivnih in koliko začasno neaktivnih.

Vrsta *M. aeruginosa* se prilagaja na spremembe svetlobe s kratkotrajnimi spremembami v številu fotosinteznih enot. Spremembe rasti zaradi sprememb  $I_S$  se ne ujemajo z značilnimi spremembami vsebnosti celičnega N in/ali C. Meritve fotosinteze pri različnih  $I_S$  pokažejo učinkovitost uporabe svetlobe in maksimalno stopnjo fotosinteze pri različnih osvetlitvah. Pri nizkih  $I_S$  pride do povečanja števila enot P700, kar nakazuje, da ima FS I večjo aktivnost pri nizkih  $I_S$ . Vrsta *M. aeruginosa* na visoke  $I_S$  odgovori s povečanjem maksimalne stopnje fotosinteze. Povečanje vključuje hitrejšo proizvodnjo elektronov, izpeljanih iz fotosinteze. Razmerje fikocianinov in klorofila *a* ostaja stalno pri svetlobi med 20 in 240  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Pri visokih  $I_S$  (565  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) vsebnost fikocianinov pade, čeprav razmerje fikocianini:klorofil in maksimalna stopnja fotosinteze narasteta, medtem ko celotna vsebnost pigmentov in izkoristek fotosinteze padeta. Stopnja rasti vrste *M. aeruginosa* se povečuje s povečevanjem svetlobe. Ocenjena  $I_S$  za kompenzacijo rasti je  $\sim 6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Raps *in sod.*, 1983).

## 2.6 POVZETEK PREGLEDA OBJAV

Fitoplankton sestavljajo fototrofni organizmi iz različnih taksonomskih skupin, večinoma alge in cianobakterije. Fitoplanktonski organizmi so pomembni primarni producenti in sodelujejo pri samočistilnih procesih v stoječih vodnih ekosistemih, prisotnost ali odsotnost določenih vrst pa kaže na prizadetost ekosistemov. Cianobakterije so zaradi svoje raznolike in unikatne fiziologije ter ekoloških posebnosti izjemno oportunistična skupina fitoplanktona, ki jo najdemo v površinskih vodnih telesih.

V stoječih celinskih vodnih telesih se lahko porušeno naravno ravnotežje odraža v prekomerni namnožitvi ene same fitoplanktonske vrste, čemur pravimo cvetenje. Masovno pojavljanje cianobakterij predstavlja resen problem tako v Sloveniji kakor tudi drugod po svetu, zlasti kadar je cvetenje toksično. V evtrofnih vodah je pogosto prisotna zelena alga *Scenedesmus quadricauda* (Breb.), ki jo zasledimo tudi med in po toksičnem cvetenju cianobakterij. Zelo pogosta je tudi cianobakterija *Microcystis aeruginosa* (Keutz.), ki je sposobna tvorbe hepatotoksičnih mikrocistinov. Toksičnost mikrocistinov za ljudi in živali je dobro raziskana, medtem ko je o njihovi vlogi in pomenu za cianobakterije in druge fitoplanktonske organizme znanega le malo. Cianobakterije izdelujejo tudi številne druge ciklične peptide, kot so npr. depsi-peptidi in ciklični peptidi z ureido vezjo, katerih vlogo je potrebno še raziskati.

Za rast in razmnoževanje fitoplanktonskih organizmov so zelo pomembni različni fizikalni, kemijski in biološki dejavniki. Najpomembnejši fizikalno-kemijski dejavniki so: svetloba, temperatura, makro in mikrohranila, antropološko vnesene snovi, mešanje, tonjenje, lebdenje, kisik, ogljikov dioksid, pH idr. Svetloba kot selektivni dejavnik distribucije vrst vpliva na fitoplankton tako s svojo kvaliteto kot s kvantiteto. Pomembni so tudi svetlotemni intervali, saj je celo ekspresija nekaterih genov (npr. genov za mikrocistine) uravnana s svetlobo.

Poleg fizikalnih in kemijskih dejavnikov, so zelo pomembni tudi biološki dejavniki in interakcije med fitoplanktonom: alelopatija, kompeticija, interakcije z bakterijami in fagi, interakcije s plenilci in različne simbiotske povezave. Zelo zanimivi so tudi principi zaznavanja celične gostote med bakterijami, tako namreč posamezni enocelični organizmi v populaciji dobijo novo dimenzijo. Obstaja kar nekaj dokazov, da so tudi cianobakterije zmožne komunicirati po principih zaznavanja celične gostote. Morda so biološko aktivne snovi cianobakterij, kot so ciklični peptidi (npr. mikrocistini, planktopeptini, anabaenopeptini), udeležene v procesih zaznavanja celične gostote ali v komunikaciji med cianobakterijskimi populacijami kot signalne molekule.

Vsem fitoplanktonskim organizmom je skupen proces fotosinteze. Mehanizem fotosinteze je zelo podoben pri algah in cianobakterijah, vendar imajo cianobakterije posebne fotosintezne značilnosti. Poleg alternativnih cikličnih poti elektronov, imajo tudi dodatne antenske pigmente v obliki fikobilisomov, ki jim omogočajo boljšo izrabo svetlobe in fotoprilagoditev. V fitoplanktonskih organizmih so procesi fotosinteze tesno povezani z drugimi procesi presnove v celici, zato predstavljajo meritve fluorescence fotosinteznih pigmentov dobro orodje za ugotavljanje različnih vplivov. Z meritvami avtofluorescence fotosinteznih pigmentov lahko ločeno zasledujemo FS I in II ter fikocianine pri cianobakterijah.

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

#### 3.1 CELIČNE KULTURE FITOPLANKTONA

Za izvedbo poskusov smo uporabljali izbrane celične linije fitoplanktona iz banke kultur Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB) (Preglednica 3). Neaksenično izolirane celične linije smo redno pregledovali z mikroskopom in sterilno precepljali v sterilni rastni medij Jaworsky (Thompson, 1988) (Preglednica 4). Sevi *M. aeruginosa* so kolonijski, vendar izbrani sevi v razmerah gojenja *in vitro* rastejo kot enocelične kulture. Toksičnost cianobakterijskih sevov smo ugotavljali na miših in s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (*ang. high performance liquid chromatography* - HPLC). Seva Ma2-NIB in Ma6-NIB sta bila netoksična pri i.p. injiciranju do 1500 mg liofiliziranih cianobakterijskih celic/kg miši (Sedmak in Kosi, 1997 a).

Preglednica 3: Seznam sevov cianobakterij in alg, ki smo jih uporabljali pri poskusih.

vrsta/sev/linija	oznaka	proizvodnja MC
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Breb.)	Sq-NIB	-*
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kuetz)	Ma-NIB	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> 1 (Kuetz)	Ma1-NIB	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> 2 (Kuetz)	Ma2-NIB	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> 4 (Kuetz)	Ma4-NIB	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> 6 (Kuetz)	Ma6-NIB	-
<i>Microcystis</i> sp.	Msp-NIB	+
<i>Microcystis</i> sp. 2	Msp2-NIB	+

\* zelene alge ne proizvajajo mikrocestinov (MC)

Kulture smo gojili v stalnih in nadzorovanih razmerah v rastni komori vsaj 10 dni pred začetkom poskusa, da so se aklimatizirale na svetlobne in temperaturne razmere. Eno precepljeno paralelko smo hranili tudi na okenski polici. Med poskusom smo 50 ml kulture gojili v steklenih 100 ml bučkah in/ali v plastičnih ploščah Nunclon®Delta (Nunc Intermed, Danska), prav tako v rastni komori v stalnih in nadzorovanih razmerah 10 - 20 dni. Vsak poskus smo naredili najmanj trikrat in vsako meritev smo izvedli na treh vzporednih vzorcih (paralelkah).

Fitoplanktonske kulture smo gojili v rastni komori pri 20 °C in dveh tipih mešane fluorescentne svetlobe (bele Osram L 18 W/72 Biolux, Sylvania GRO-Lux F 18 W/GRO-T8) z intenziteto svetlobe 10 ali 50  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Periodo osvetljevanja svetloba:tema je bila 8:16 ur. Intenziteto oz. jakost svetlobe smo izmerili na zunanji strani bučk/plošč z aparatom Delta-T Logger (Delta-T Devices Ltd., UK) opremljen s senzorjem QS Quantum.

Preglednica 4: Medij Jaworsky za gojenje fitoplanktonskih organizmov, pH 7,3 (Thompson, 1988)

<b>snov</b>	<b>koncentracija</b>
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2,0 g/100 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,24 g/100 ml
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 g/100 ml
$\text{NaHCO}_3$	1,59 g/100 ml
$\text{NaNO}_3$	3,0 g/100 ml
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	3,6 g/100 ml
EDTAFeNa	0,225 g/100 ml
EDTANa <sub>2</sub>	0,225 g/100 ml
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,248 g/100 ml
$\text{MnC}_{12} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,139 g/100 ml
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,10 g/100 ml
biotin	0,004 g/100 ml
cianokobalamin	0,004 g/100 ml
tiamin HCl	0,004 g/100 ml

## 3.2 POSKUSI

### 3.2.1 Umeritvene krivulje

Naredili smo dva različna tipa umeritvenih krivulj: fluorescenco ( $F$ ) v odvisnosti od števila celic/ml in vsebnost pigmentov v odvisnosti od števila celic/ml. Umeritvene krivulje smo uporabljali za oceno intervala gostote celic, kjer je odvisnost med spremenljivkama linearna, saj nam je to omogočalo preračunavanje  $F$  ali vsebnosti pigmentov na celico in za oceno števila celic, kadar štetje pod mikroskopom ni bilo mogoče.

Izbrali smo dva seva cianobakterije *M. aeruginosa*: Ma1-NIB, ki proizvaja MC in Ma2-NIB, ki MC ne proizvaja. Cianobakterije smo gojili pri dveh različnih osvetlitvah: 10 in 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Različnim gostotam kultur smo izmerili  $F$  in vsebnost dveh fotosinteznih pigmentov: klorofila  $a$  in fikocianinov. Različne gostote celic smo dosegli na dva načina: neposredno z rastjo do zelene gostote in z redčenjem gostih kultur v bolj redke.

### 3.2.2 Vpliv gostote kultur na hitrost delitve

Poskuse smo izvajali na dveh celičnih linijah cianobakterij: Ma1-NIB, ki proizvaja MC in Ma2-NIB, ki jih ne. Poskuse vpliva gostote smo zasnovali tako, da smo primerjali obnašanje celic v začetni, eksponentni in stacionarni fazi rasti pri dveh različnih osvetlitvah: 10 in 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Iz goste kulture ( $7 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  celic/ml) smo nastavili tri različne koncentracije kultur cianobakterij:  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$  in  $2 \times 10^6$  celic/ml in zasledovali njihovo število, premer,  $F$  klorofila in fikocianinov ter vsebnost klorofila  $a$ . Po podvojitvi števila celic v določeni bučki smo kulture zopet razredčili na izhodne koncentracije. To smo ponovili še dvakrat, potem pa pustili, da vse kulture dosežejo stacionarno fazo rasti. Pri osvetlitvi 10  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  smo vse kulture, ne glede na to ali je bila kultura vzdrževana pri redki ( $2 \times 10^4$  celic/ml), srednji ( $2 \times 10^5$  celic/ml) ali visoki ( $2 \times 10^6$  celic/ml) gostoti celic, pustili rasti do gostote  $5 \times 10^6$  celic/ml, potem pa jih ponovno razredčili na  $2 \times 10^4$  celic/ml in spet spremljali rast do  $5 \times 10^6$  celic/ml.

### 3.2.3 Kompeticijski poskusi

Zmešali smo enake volumne enako gostih kultur cianobakterij, ki se delijo približno enako hitro in se razlikujejo po velikosti in proizvodnji MC (Ma1-NIB in Ma2-NIB). Dnevno smo ugotavljali število, premer, vsebnost MC,  $F$  klorofila in fikocianinov ter koncentracije klorofila  $a$  obeh monokultur in njihovih mešanic. Na koncu poskusa smo monokulture in mešanice zamrzili, liofilizirali in ekstrakt liofiliziranih kultur nanесли na HPLC za določanje vsebnosti MC. Primerjali smo parametre mešanic in monokultur.

### 3.2.4 Poskusi z različnimi stresnimi dejavniki

Naš namen je bil ugotoviti, kako se izbrane celične linije fitoplanktona odzivajo na različne snovi in postopke, ki močno vplivajo na fiziologijo celic. Podatki o delovanju znanih inhibitorjev, ki smo jih pridobili s poskusi, so nam služili za primerjavo z mehanizmi delovanja biološko aktivnih snovi. Izbrali smo snovi, ki delujejo specifično; npr. za inhibicijo fotosinteze smo izbrali DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethyl-urea, Sigma, Nemčija) v končni koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  (Oettmeier in Soll, 1983), za



inhibicijo dihanja KCN (potassium azanylidynemethane, Sigma, Nemčija) v končni koncentraciji 1  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  in 2  $\mu\text{M}$  in za inhibicijo sinteze celične stene Bacitracin (Fluka, Švica) v končni koncentraciji 20  $\mu\text{M}$ . Ustvarili smo tudi druge stresne situacije, kot so prisotnost reduciranega detergenta Triton<sup>®</sup> X-100 (Sigma, Nemčija) v končni koncentraciji 0,1 in 0,01 %, zamrzovanje kultur (-20 °C, 2 uri) in 5 minutno obdelovanje 5 ml kulture z ultrazvokom (Ultrasonic homogeniser Cole & Parmer, Chicago Illinois), ki v celicah izzovejo nespecifične fiziološke spremembe. Poskuse smo izvajali na naslednjih celičnih linijah cianobakterij: Ma-NIB, Ma1-NIB in Ma2-NIB. Predhodno aklimatizirane kulture smo obdelali z enim izmed zgoraj navedenih načinov, nato smo s svetlobnim mikroskopom dnevno opazovali morfološke spremembe v fitoplanktonski kulturi, kulturo prešteli in izmerili velikost celic. Vsak drugi dan smo merili tudi *in vivo*  $F$ , saj se stres v fitoplanktonski celici običajno odraža tudi v povišani  $F$  (Snel *in sod.*, 1998).

### 3.2.5 Poskusi z mikrocistini (MC)

MC smo izolirali v našem laboratoriju po ustaljenem postopku (Sedmak in Kosi, 1997 a; 1998), ki smo ga še dodatno optimizirali. Molsko maso in čistost smo potrdili z masno spektroskopijo. Čistost, zadrževalni čas in absorpcijski spekter izoliranih MC pri analizah s HPLC smo potrdili z uporabo komercialnih MC (MC-LR Sigma, MC-RR Calbiochem). Naš namen je bil simulirati okolje, ki vlada v cianobakterijskem cvetu, kjer celice dosežejo tudi koncentracije do  $10^{11}$  celic/ml. Ob predpostavkah, da celica proizvede  $0,5 \times 10^{-12}$  g MC na celico, da ima povprečen MC molekulsko maso okoli 1000 in povprečnem sproščanju 1 % lahko izračunamo hipotetično koncentracijo  $5 \times 10^{-7}$  M MC, ki smo jo uporabljali že v predhodnih poskusih (Sedmak in Kosi 1998; Eleršek, 2001; Sedmak in Eleršek, 2005).

Poskuse z MC smo izvajali na naslednjih celičnih linijah fitoplanktonskih organizmov: Sq-NIB, Ma1-NIB, Ma2-NIB, Ma4-NIB, Ma6-NIB. Predhodno aklimatiziranim kulturam fitoplanktona gostote  $5 \times 10^5$  celic/ml smo v njihovi eksponentni fazi rasti, na začetku poskusa (dan 0) dodali izbrane MC: MC-LR, MC-RR, MC-YR ali [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v končni koncentraciji  $10^{-7}$  ali  $5 \times 10^{-7}$  M. Rastopili smo jih bodisi v metanolu bodisi v etanolu. Končna koncentracija metanola/etanola v gojišču ni nikoli presegala 0,05 % (volumskih odstotkov). Po dodatku MC smo s svetlobnim mikroskopom dnevno opazovali morfološke spremembe v fitoplanktonski kulturi, kulturo smo prešteli in izmerili velikost celic. Vsak drugi dan smo merili tudi *in vivo*  $F$ , vsebnost fotosinteznih pigmentov; klorofila *a* in fikocianinov. Supernatante kultur smo do analize s HPLC hranili v zamrzovalniku (-20 °C).

### 3.2.6 Poskusi s planktopeptinom BL1125 (PP) in anabaenopeptinom B (AnP B)

Iz cveta *P. rubescens* (DC. ex Gomont) iz Blejskega jezera smo izolirali štiri različne ciklične peptide: PP, AnP B, AnP F in doslej še neopisani ciklični peptid, ki smo ga označili kot CP I. Molsko maso in čistost smo potrdili z masno spektroskopijo.

Poskuse s PP in AnP B smo izvajali na naslednjih celičnih linijah fitoplanktonskih organizmov: Sq-NIB, Ma-NIB, Ma1-NIB, Ma2-NIB, Ma4-NIB, Ma6-NIB, Ma15-NIB, Msp-NIB in Msp2-NIB. Predhodno aklimatiziranim kulturam fitoplanktona smo v njihovi eksponentni fazi rasti, na začetku poskusa (dan 0), dodali izbrano biološko aktivno snov (PP ali AnP B) v znani koncentraciji. Rastopili smo jih bodisi v metanolu bodisi v etanolu.

Končna koncentracija metanola/etanola v gojišču nikoli ni presegala 0,2 % (volumskih odstotkov). PP smo dodali kulturam gostote  $5 \times 10^5$  celic/ml v končni koncentraciji  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  M. AnP B smo dodali kulturam gostote  $5 \times 10^5$  celic/ml v končni koncentraciji  $10^{-6}$  ali  $10^{-7}$  M. Po dodatku aktivnih snovi smo s svetlobnim mikroskopom dnevno opazovali morfološke spremembe v fitoplanktonski kulturi, kulturo prešteli in izmerili velikost celic. Vsak drugi dan smo merili tudi  $F$  in naredili ekstrakcije fotosinteznih pigmentov: klorofila *a* in fikocianinov. Supernatante kultur smo do analize s HPLC hranili v zamrzovalniku ( $-20$  °C).

### 3.3 MERITVE

#### 3.3.1 Število celic

Za štetje smo uporabljali števno komoro Bürker-Türk hemocitometer globine 0,1 mm. Celice so bile najbolj vidne pod faznim kontrastom pri povečavi 200 ali 400-krat. V vsakem vzorcu smo prešteli vsaj 100-200 celic. Prešteli smo vsaj po 8 vzorčnih enot (ena vzorčna enota so 4 kvadrati v diagonali ene števne mrežice) in upoštevali, da mora biti število prešteti celic čim večje, da je napaka tem manjša (Wetzel in Likens, 1995). Preštete vzorčne enote smo pomnožili z ustreznim faktorjem in izračunali aritmetično sredino ter standardni odklon. Primerjali smo krivuljo števila celic v kulturi z dodano aktivno snovjo in krivuljo števila celic kontrolne kulture. Razlika v krivuljah, kjer se standardni odkloni obeh krivulj ne prekrivajo, je posledica delovanja aktivne snovi. Statistične razlike smo testirali s T-testom.

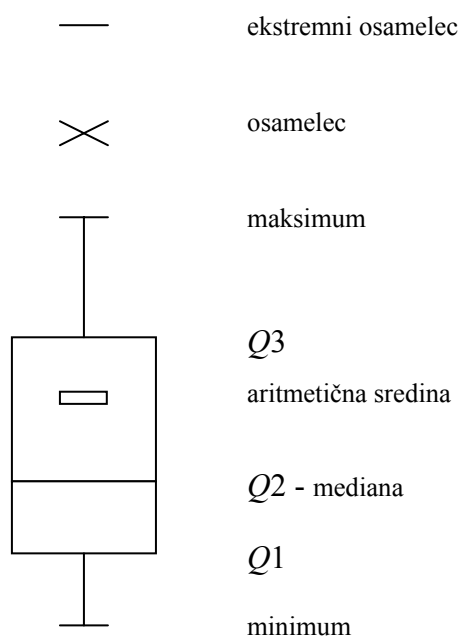
#### 3.3.2 Volumen celic

Na digitalnih fotografijah, ki smo jih posneli z digitalno kamero (DXM 1200, Nikon), priključeno na mikroskop (Eclipse TE300, Nikon), smo s pomočjo programske opreme LUCIA (System for Image Processing and analysis LUCIA 4.60, Laboratory Imaging Ltd.) izmerili parametre  $A$ -dolžina posamezne celice v cenobiju,  $B$ -širina posamezne celice v cenobiju (za zeleno alga *S. quadricauda*) in  $R$ -premer (za cianobakterije *Microcystis* spp.) vsaj stotih naključno izbranih celic ter po spodnjih formulah (Wetzel in Likens, 1995) izračunali volumen:

$$VOLUMEN Sq = \frac{\pi AB^2}{6}$$

$$VOLUMEN Ma spp. = \frac{\pi R^3}{6}$$

Volumne ( $\mu\text{m}^3$ /celico) smo prikazali z okvirjem z ročaji (*ang. box and whiskers plot*, Origin 5.0, Microcal Software Inc.). Okvir z ročaji zelo nazorno prikaže obliko porazdelitve spremenljivk, njene kvartile ( $Q$ ), variacijski in kvartilni razmak, ki ga odčitamo v dolžini okvira. Pravokotnik v okvirju predstavlja aritmetično sredino. Spodnji ročaj določata vrednosti minimuma in prve kvartile  $Q1$ , zgornji ročaj določata vrednosti tretje kvartil  $Q3$  in maksimuma. Maksimum in minimum dobimo tako, da poiščemo največjo in najmanjšo vrednost spremenljivke, ki niso osamelci. Okvir določata kvartila



$Q1$  in  $Q3$ , njegovo prečko pa mediana  $Q2$ . Osamelci so vrednosti spremenljivke, ki ležijo zunaj intervala ( $Q1-1,5Q$ ,  $Q3-1,5Q$ ), ekstremni osamelci pa so tisti osamelci, ki so zunaj intervala ( $Q1-3Q$ ,  $Q3-3Q$ ), pri čemer je  $Q = Q3-Q1$  kvartilni razmik (Košmelj, 1995).

### 3.3.3 Vsebnost fotosinteznih pigmentov

#### 3.3.3.1 Vsebnost klorofila *a*

Vsebnost klorofila *a* smo ugotavljali po metodi ekstrakcije z metanolom (Vollenweider 1969; 1974; Rieman in Ernst, 1982) s spektrofotometrom UV-2101 PC (Shimadzu). Celice smo 10 min centrifugirali pri 13000 o/min, supernatante nadomestili z metanolom (Merck) in jih zamrznili čez noč. Naslednji dan smo vzorce eno uro ekstrahirali v vodni kopeli pri 50 °C. Vzorce smo vmes večkrat dobro premešali, jih centrifugirali in supernatantom izmerili vsebnost pigmentov pri valovnih dolžinah 665 in 750 nm. Izračunali smo srednjo vrednost treh paralelk. Koncentracijo klorofila izraženo v  $\mu\text{g/ml}$  smo izračunali po spodnji formuli, kjer  $A$  predstavlja absorbanco pri določeni valovni dolžini,  $V$  volumen v ml in  $l$  dolžino optične poti skozi topilo v cm.

$$\text{konc. klorofila } a [\mu\text{g} / \text{ml}] = \frac{13,9 \times V_{\text{metanola}} \times (A_{665} - A_{750})}{l \times V_{\text{vzorca}}}$$

#### 3.3.3.2 Vsebnost fikocianinov

Kulturo celic smo prefiltrirali skozi Whatman GF/C stekleni mikrofilter (Whatman), zmacerirali s fosfatnim pufrom (pH 6,8) in spektrofotometrično izmerili vsebnost pigmentov pri valovnih dolžinah 565, 620, 650 in 750 nm (Lee *in sod.*, 1994). Merili smo s spektrofotometrom UV-2101 PC (Shimadzu) in izračunali srednjo vrednost treh paralelk. Koncentracijo fikocianinov izraženo v  $\mu\text{g/ml}$  smo izračunali po spodnji formuli, kjer  $A$  predstavlja absorbanco pri določeni valovni dolžini.

$$\text{konc. fikocianinov} [\mu\text{g} / \text{ml}] = 198 \times (A_{620} - A_{750}) - 133 \times (A_{650} - A_{750}) - 0,19 \times (A_{565} - A_{750})$$

### 3.3.4 Fluorescenca fotosinteznih pigmentov

*In vivo* fluorescenca ( $F$ ) smo merili s fluorimetrom Jasco FP-750. Spremembe  $F$  klorofila smo zasledovali v rdečem spektru (emisija -  $\lambda_{\text{em}}$  680 nm) in rdečem spektru daljših valovnih dolžin ( $\lambda_{\text{em}}$  730 nm). Za vzbuditev (ekscitacija -  $\lambda_{\text{ex}}$ ) elektronov smo uporabljali valovno dolžino 440 nm, pri kateri ima  $\gamma$  področje klorofila zelo visoko absorbanco (Lee *in sod.*, 1994). Z metodo po Eullauffroy in Vernet (2003) smo ugotavljali razmerje med  $F$  pri  $\lambda_{\text{em}}$  680 in 730 nm pri  $\lambda_{\text{ex}}$  440 nm (širina  $\lambda_{\text{ex}}$  in  $\lambda_{\text{em}}$  rezine: 10 nm, odgovor: 1 sek., občutljivost: visoka, število ciklov: 3, temperatura: 25 °C). Pred merjenjem  $F$  smo vzorce hranili v temi 2 uri, da smo dosegli minimalno  $F - F_0$ . Za merjenje  $F$  fikocianinov smo uporabljali  $\lambda_{\text{ex}}$  620 nm in  $\lambda_{\text{em}}$  645 nm (Lee *in sod.*, 1994). Da smo dosegli maksimalno  $F$  FS II, smo kulture fitoplanktonskih organizmov dodajali DCMU v končni koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  (Lee *in sod.*, 1994). Meritve *in vivo*  $F$  smo merili v treh paralelkah. Umeritvene krivulje smo izdelali za seva Ma1-NIB in Ma2-NIB.

### 3.3.5 Epifluorescentna mikroskopija

Spremembe v *F* fotosinteznih pigmentov fitoplanktonskih organizmov smo zasledovali tudi s pomočjo sistema mikroskopa Eclipse TE300 (Nikon), digitalne kamere (DXM 1200, Nikon), fluorescentne osvetlitve (Super high pressure mercury lamp power supply, Nikon) in širokospektralnega modrega filtra B2A ( $\lambda_{\text{ex}}$  450-490 nm, Nikon).

### 3.3.6 Masna spektroskopija

Molsko maso in čistost izoliranih cikličnih peptidov smo ugotavljali z masnim spektrometrom Finnigan LCQ (Thermo Finnigan, San Jose, USA) s klasično ionsko pastjo in elektrosprej ionizacijo (*ang.* *ESI ion source*). Vzorci so bili raztopljeni v čistem metanolu. Razmere analize so bile sledeče: neposreden vbrizg, pretok 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ , način - *full scan* (*ang.*) 150-2000  $m/z$ , *sheath gas flow* (*ang.*) 60 arbitrarnih enot, *auxillary gas flow* (*ang.*) 5 arbitrarnih enot, *tube lens offset* (*ang.*) 55 V, napetost kapilare 40 V, temperatura kapilare 220 °C, napetost spreja 6 kV in polarnost pozitivna.

### 3.4 EKSTRAKCIJE IN IZOLACIJE CIKLIČNIH PEPTIDOV

Ciklične peptide smo iz cianobakterij izolirali po ustaljenem postopku (Sedmak in Kosi, 1997 a; 1998). Celoten postopek je sestavljen iz več korakov. Za izolacijo smo uporabljali tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – HPLC (Waters Millipore Division).

#### 3.4.1 Priprava vzorca za analitsko HPLC kolono

V prvem delu postopka smo cianobakterijske kulture posušili z liofilizerjem (Christ, Nemčija). Suhemu materialu (50-200 mg) smo dodali 5% očetno kislino (2 ml) in ekstrahirali z mešanjem na magnetnem mešalu vsaj pol ure. Vzorec smo centrifugirali (4000 o/min, 10 min) in spravili supernatant. Usedlino smo resuspendirali z očetno kislino in cel postopek ekstrakcije z mešanjem in centrifugiranjem 3-krat ponovili. Supernatante vseh treh ekstraktov smo združili in zamrznili čez noč, da so se predvsem sluzaste komponente pri naslednjem centrifugiranju boljše ločile. Po odmrznitvi vzorca v temi na sobni temperaturi in večkratnem centrifugiranju smo vzorec očistili usedlin. Tako je bil pripravljen za nanos na predpripravljene kolone 100 mg LiChrolut RP-18 (Merck), kar predstavlja drugi del postopka ekstrakcije in izolacije.

Kolone RP-18 (100 mg) smo aktivirali s spiranjem z 1,5 ml čistega metanola (HPLC Methanol, Merck) in z 1,5 ml bidestilirane vode. Vzorec smo nanесли na kolono in jo spirali s 4 ml 10 % metanola. Ciklične peptide smo sprali s kolone s čistim metanolom z 2-krat po 0,5 ml. Vzorce smo posušili s prepihanjem z dušikom in shranili v zmrzovalniku (-20 °C).

Vzorec smo pred nanosom na analitsko HPLC kolono raztopili v čistem metanolu. Za ugotavljanje in določitev koncentracij cikličnih peptidov smo uporabljali sistem HPLC z analitsko kolono LiChrospher 100 RP-18 (Merck). V različnih vrhovih (*ang. peak*) smo s pomočjo značilnih absorpcijskih spektrov in zadrževalnih časov določili prisotnost in vsebnost določenega cikličnega peptida.

#### 3.4.2 Priprava vzorca za preparativno HPLC kolono

Za izolacijo cikličnih peptidov iz cveta cianobakterij, ki smo ga nabrali v naravi, smo uporabljali večje volumne kemikalij. Liofoliziranim cianobakterijam (1000-2000 mg) smo dodali 20 ml 5% očetne kisline in z mešanjem na magnetnem mešalu ekstrahirali vsaj pol ure. Vzorec smo centrifugirali (4000 o/min, 10 min) in spravili supernatant. Usedlino smo resuspendirali z očetno kislino in cel postopek ekstrakcije z mešanjem in centrifugiranjem 3-krat ponovili. Supernatante vseh treh ekstraktov smo združili in zamrznili čez noč. Po odmrznitvi vzorca v temi na sobni temperaturi in večkratnem centrifugiranju smo vzorec očistili usedlin. Tako je bil pripravljen za nanos na predpripravljene kolone 500 mg LiChrolut RP-18 (Merck), kar predstavlja drugi del postopka ekstrakcije in izolacije.

Kolone RP-18 (500 mg) smo aktivirali s spiranjem z 10 ml čistega metanola in z 10 ml bidestilirane vode. Vzorec smo nanесли na kolono in jo spirali s 4 ml 10 % metanola. Ciklične peptide smo sprali s kolone s čistim metanolom z 2-krat po 2 ml. Vzorce smo posušili s prepihanjem z dušikom in shranili v zmrzovalniku (-20 °C).

Vzorec smo pred nanosom na preparativno HPLC kolono raztopili v mobilni fazi. Uporabljali smo sistem HPLC s preparativno kolono Spherisorb (Alltech Associates). Vrhovom smo s pomočjo značilnih absorpcijskih spektrov in zadrževalnih časov določili prisotnost in vsebnost določene biološko aktivne snovi. Združene frakcije (10-50 ml) smo posušili na rotovaporju, dodali 5% ocatno kislino (5 ml), dobro premešali in s stekleno siringo (Hamilton) nanesli na predhodno aktivirane 100 mg LiChrolut RP-18 kolone, jih spirali najprej z 0,5 ml 10% metanola, nato sprali z 2-krat po 0,5 ml čistega metanola in vzorce posušili s prepihanjem z dušikom. Čistost in molsko maso smo preverili z masno spektroskopijo. Tako pripravljene ciklične peptide smo do uporabe v poskusih hranili v zmrzovalniku (-20 °C).

## 3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

### 3.5.1 Absolutne mere variabilnosti

Pri ugotavljanju števila celic, volumnov in vsebnosti fotosinteznih pigmentov smo dobljenim vrednostim izračunali standardne odklone (SD) po enačbi za vzorce populacije s prostostno stopnjo  $n-1$ , pri čemer  $n$  predstavlja število enot (število paralelnih poskusov) in  $x$  vrednost faktorja v posamezni paralelki v posameznem dnevu.

$$SD = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

### 3.5.2 Linearna regresija

Kadar smo želeli oceniti povezanost neodvisne ( $x$ ) in odvisne ( $y$ ) spremenljivke, smo podatke analizirali z linearno regresijo. Pri linearni regresiji iščemo koeficienta enačbe  $y = ax + b$ . Regresijski koeficient  $R^2$  nam pove kolikšen odstotek variacije odvisne spremenljivke lahko razložimo z neodvisno spremenljivko. Poleg enačbe premice in regresijskega koeficienta je pomemben podatek tudi vrednost  $P$ . To vrednost dobimo iz analize variance regresijskega modela za izračunano vrednost  $F$  (iz tabel). V primeru, da je vrednost  $P$  manjša od stopnje zaupanja (0,05), zavrnilo ničelno hipotezo, da je  $a$  enak 0 (če je  $a$  nič, pomeni, da ni naraščanja ali padanja  $y$  zaradi  $x$ ), kar pomeni, da obstaja statistično značilna povezava med spremenljivkama.

### 3.5.3 Testiranje hipotez

Vse nize podatkov, kjer smo hoteli preveriti ali je razlika med kontrolnimi celicami in celicami, ki smo jim dodali aktivne snovi res značilna, smo analizirali s T-testom ali z Mann-Whitney-evim testom. Na koncu vsakega napisa k sliki smo dodali kratek statistični opis statistično značilnih razlik, ki so z zvezdico označene tudi na sliki sami. Vse statistične analize smo izvajali s statističnim programom PAST (Hammer *in sod.*, 2001).



## 4 REZULTATI

### 4.1 ORGANIZACIJA POGLAVJA REZULTATI

Rezultate smo razdelili na več področij raziskav fitoplanktonskih organizmov: od iskanja ustreznih razmer in osnovnih značilnosti populacij do specifičnih odgovorov populacij na obdelovanje z različnimi snovmi. Drugo podpoglavje (4.2) sestavljajo umeritvene krivulje, tretje podpoglavje (4.3) opisuje vplive gostote kultur cianobakterij na njihovo dinamiko delitev in rasti ter četrto (4.4) kompeticijske odnose med različnimi cianobakterijskimi sevi. Peto podpoglavje (4.5) opisuje vplive znanih snovi in postopkov, ki delujejo stresno na fitoplanktonske organizme bodisi specifično neposredno bodisi posredno. Šesto podpoglavje (4.6) govori o vplivih MC, sedmo (4.7) pa o vplivu drugih cikličnih peptidov iz cianobakterij. Končni cilj je bil ugotavljanje učinkov MC, depsipectida PP in peptida z ureido vezjo AnP B - na izbrane fitoplanktonske organizme.

### 4.2 UMERITVENE KRIVULJE

Umeritvena krivulja je standardna metoda za ugotavljanje koncentracij glede na vrednosti merjenih parametrov. Naše umeritvene krivulje opisujejo odnos med številom celic/ml in njihovo fluorescenco ( $F$ ) ali vsebnostjo fotosinteznih pigmentov. Umeritvene krivulje, ki smo jih pridobili neposredno z rastjo do zelene gostote ali z redčenjem gostih kultur v bolj redke, se med seboj ne razlikujejo. Število celic/ml, primerno za meritve, je bilo od  $2 \times 10^5$  celic/ml do  $1 \times 10^7$  celic/ml. Število celic/ml kaže linearno odvisnost tako s  $F$  pigmentov kot z vsebnostjo pigmentov v intervalu od  $5 \times 10^5$  do  $5 \times 10^6$  celic/ml. V tem intervalu je upravičeno tudi preračunavanje parametrov iz vrednosti na mililiter kulture v vrednosti na posamezno celico. Število celic/ml in njena  $F$  kažeta linearno odvisnost tako pri posameznem poskusu (Slika 7) kot pri skupku rezultatov iz različnih poskusov (Slika 8, 9, 10 in 11) pri osvetlitvi 10 in 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Linearni trendi se med sevom Ma1-NIB, ki proizvaja MC (Slika 8 in 10) in Ma2-NIB, ki ne proizvaja MC (Slika 9 in 11), ne razlikujejo bistveno. Večinoma kažejo višjo  $F$  oz. vsebnost pigmentov pri nižji osvetlitvi. Ponekod se trendne črte  $F$  oz. vsebnosti klorofila glede na število celic/ml pri osvetlitvah 10 in 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  prekrivajo (Slika 9 B in 10 B).

### 4.3 VPLIV GOSTOTE CELIC

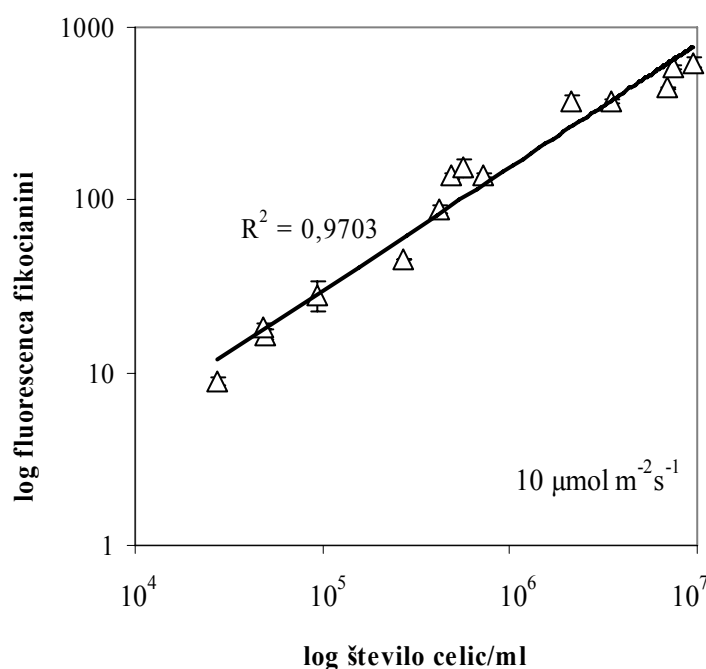
#### 4.3.1 Vpliv gostote na hitrost delitve

Delitve cianobakterij, preden dosežejo stacionarno fazo, lahko opišemo z eksponentno krivuljo, zato smo za lažjo primerjavo hitrosti delitve različno gostih kultur uporabljali logaritmirano ordinatno os. Kulture cianobakterij Ma1-NIB (Slika 12) in Ma2-NIB (Slika 13), ki smo jih z redčenjem vzdrževali pri treh različnih gostotah ( $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$  in  $2 \times 10^6$  celic/ml), so rasle s podobno dinamiko. Pri osvetlitvi 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se celice delijo hitreje kot pri osvetlitvi 10  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Slika 12). Ugotovili smo, da se na začetku poskusa celice delijo najpočasneje, imajo najdaljšo fazo prilagajanja, kar je posebej dobro vidno na Slikah 12 B in 14. Različne kulture imajo različno dolge faze prilagajanja. Dolžina faze prilagajanja srednje gostih kultur pri osvetlitvi 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  je za Ma1-NIB 3-4 dni in za

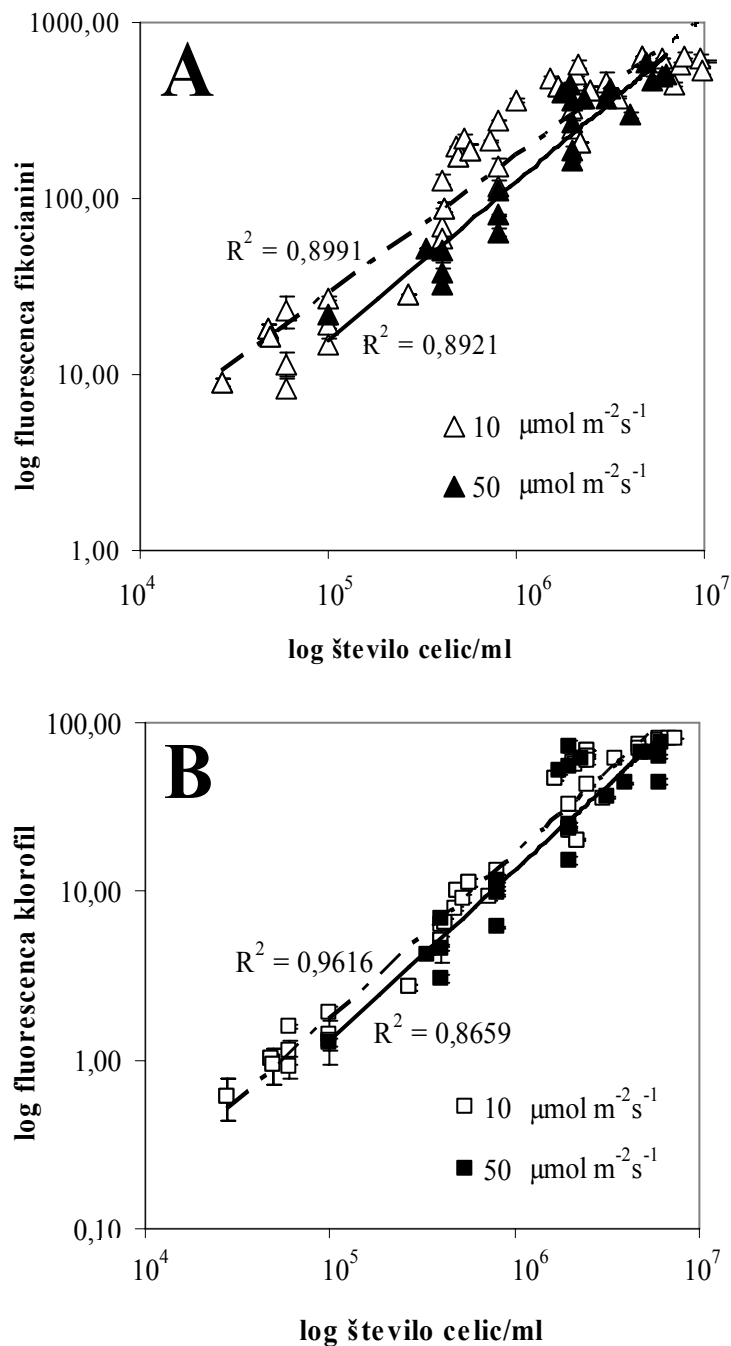
Ma2-NIB 1-2 dni. Pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  je dolžina faze prilagajanja za Ma1-NIB 5-7 dni in za Ma2-NIB 2 dni.

Generacijski časi se med sevi razlikujejo. Pri osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  je povprečni generacijski čas srednje gostih kultur za Ma1-NIB  $3,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$ , za Ma2-NIB  $3,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$  in za Ma4-NIB  $2,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$ . Pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  je povprečni generacijski čas srednje gostih kultur za Ma1-NIB  $3,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$  in za Ma2-NIB  $3,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ . Število dni, ki jih potrebujejo kulture po tretjem redčenju, da dosežejo gostoto  $5 \times 10^6$  celic/ml, je prikazano s histogrami (Slika 15 A).

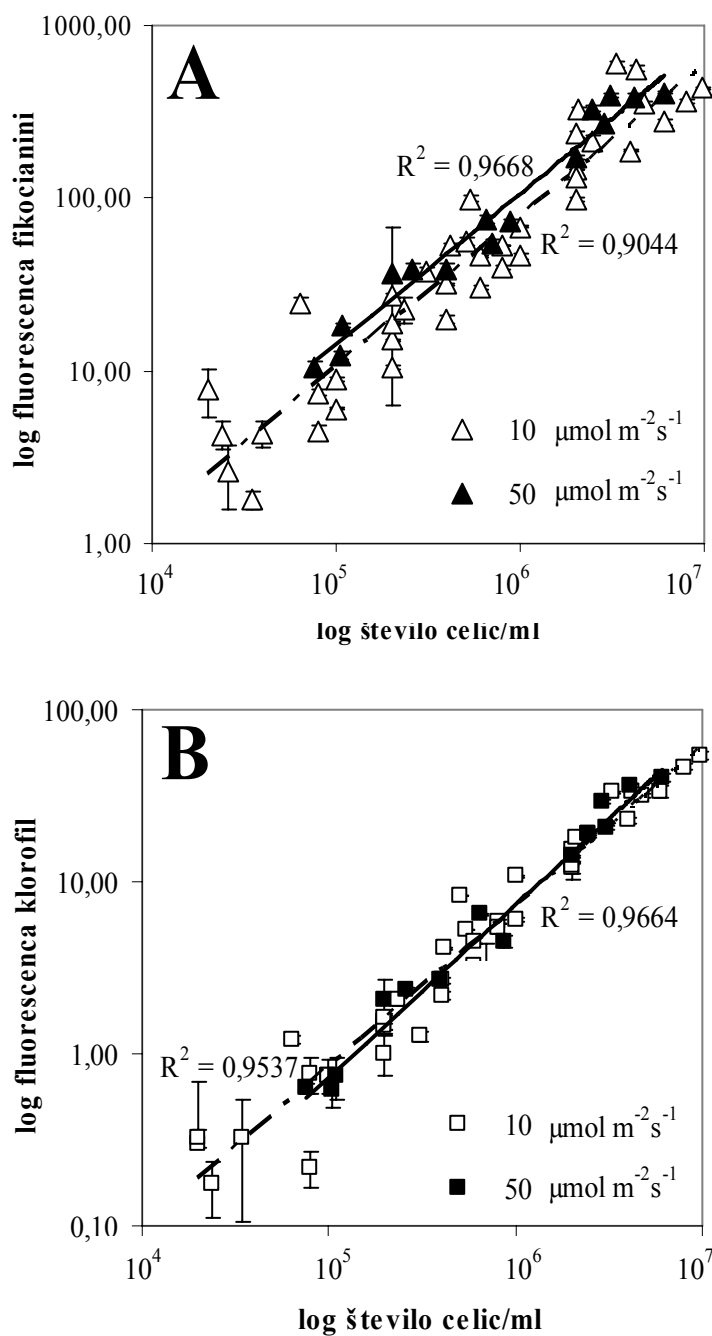
Hitrost delitve celic pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , ki jih vzdržujemo pri visoki ( $2 \times 10^6$  celic/ml), srednji ( $2 \times 10^5$  celic/ml) ali nizki ( $2 \times 10^4$  celic/ml) gostoti, se po redčenju v redko kulturo, med seboj le malo razlikujejo (Slika 14). Po tretjem redčenju kultur smo namreč vse kulture (redke, srednje in goste) razredčili s svežim medijem in jih pustili rasti do stacionarne faze. Hitrost delitve ( $\Delta y/\Delta x$ ) po tretjem redčenju je bila za gsto kulturo  $2,5 \times 10^5$ , za srednjo kulturo  $3,0 \times 10^5$  in za redko kulturo  $3,6 \times 10^5$  celic/ml/dan. Generacijski čas za Ma1-NIB znaša 3,7 za gsto, 3,6 za srednjo in 3,2 dni/generacijo za redko kulturo.



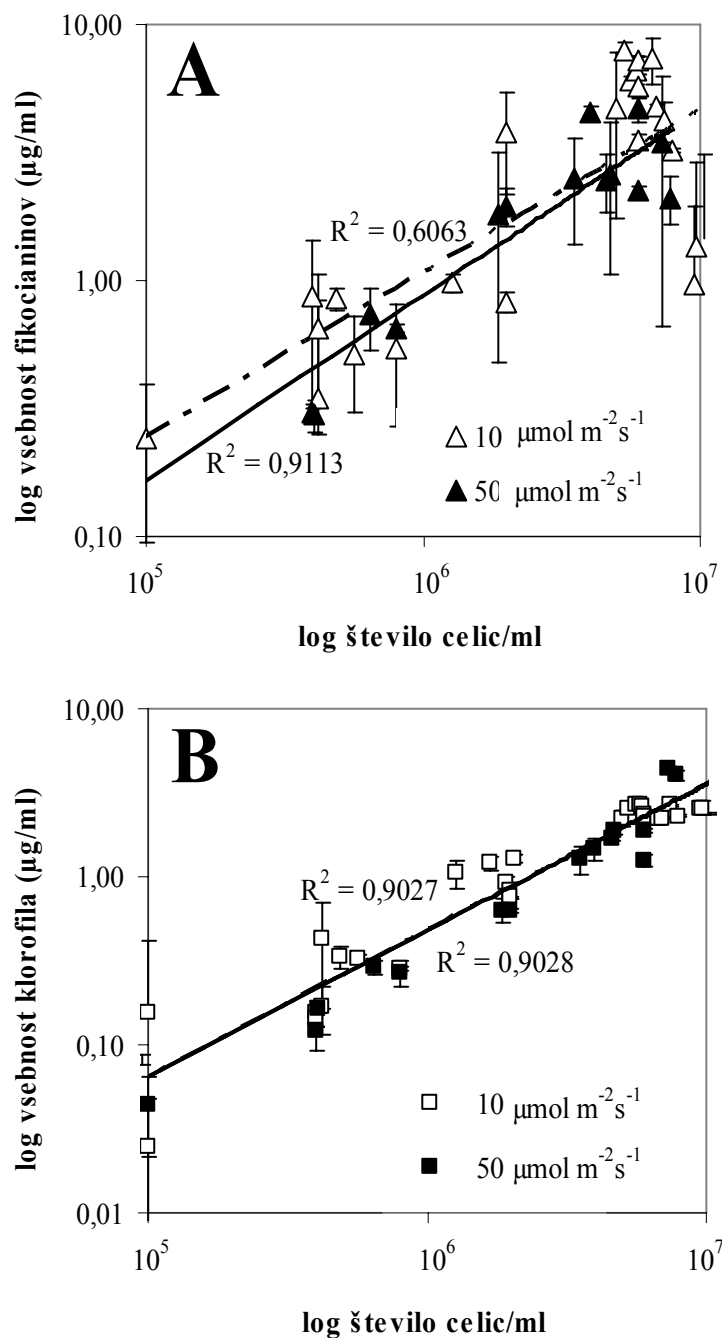
Slika 7: Linearno razmerje med *in vivo* fluorescenco fikocianinov in številom celic/ml kulture *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, ki smo jo gojili pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Dodana je trendna črta in vrednost  $R^2$ .



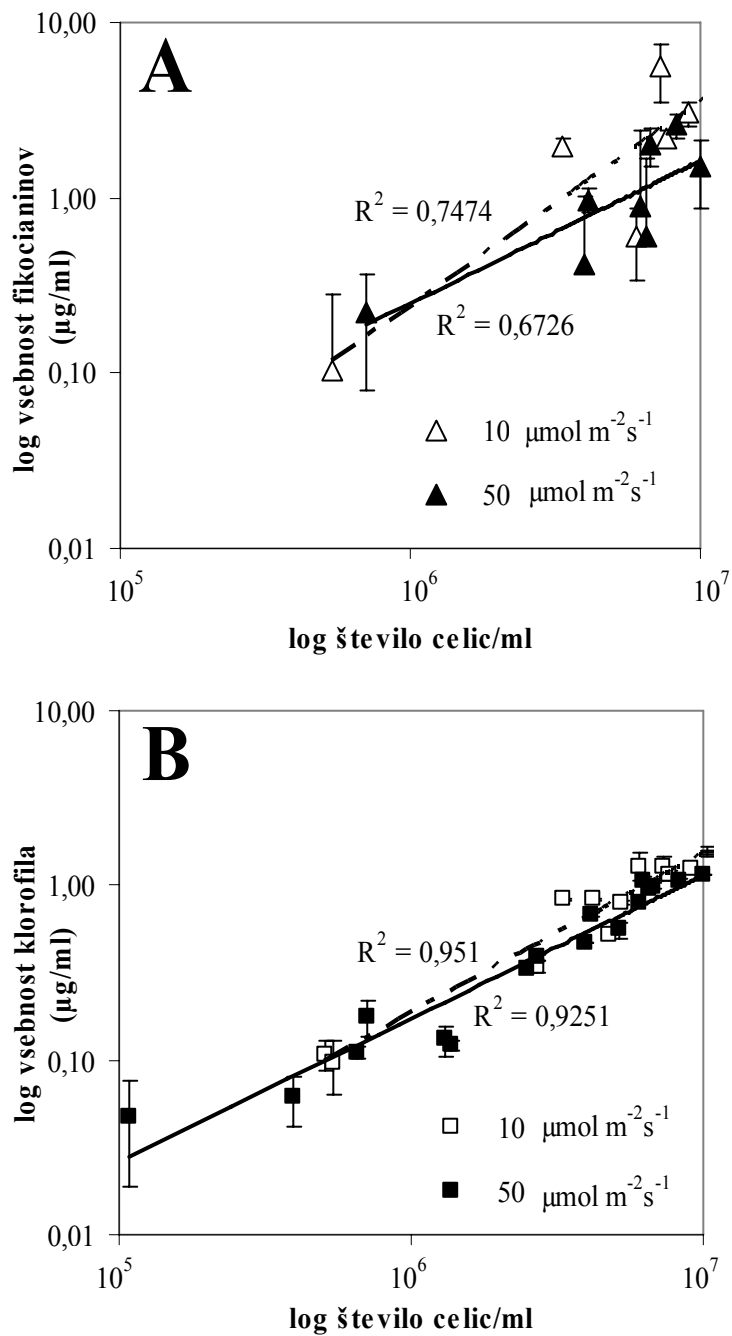
Slika 8: Razmerje med *in vivo* fluorescenco in številom celic/ml kulture *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB pri dveh različnih osvetlitvah; (A) fluorescena fikocianinov (B) fluorescena klorofila *a*. Prikazane so aritmetične sredine  $\pm$  SD. Izmerjenim vrednostim so dodane vrednosti  $R^2$  in trendne črte: polne črte za kulture, ki so rasle pri  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in prekinjene črte za kulture, ki so rasle pri  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



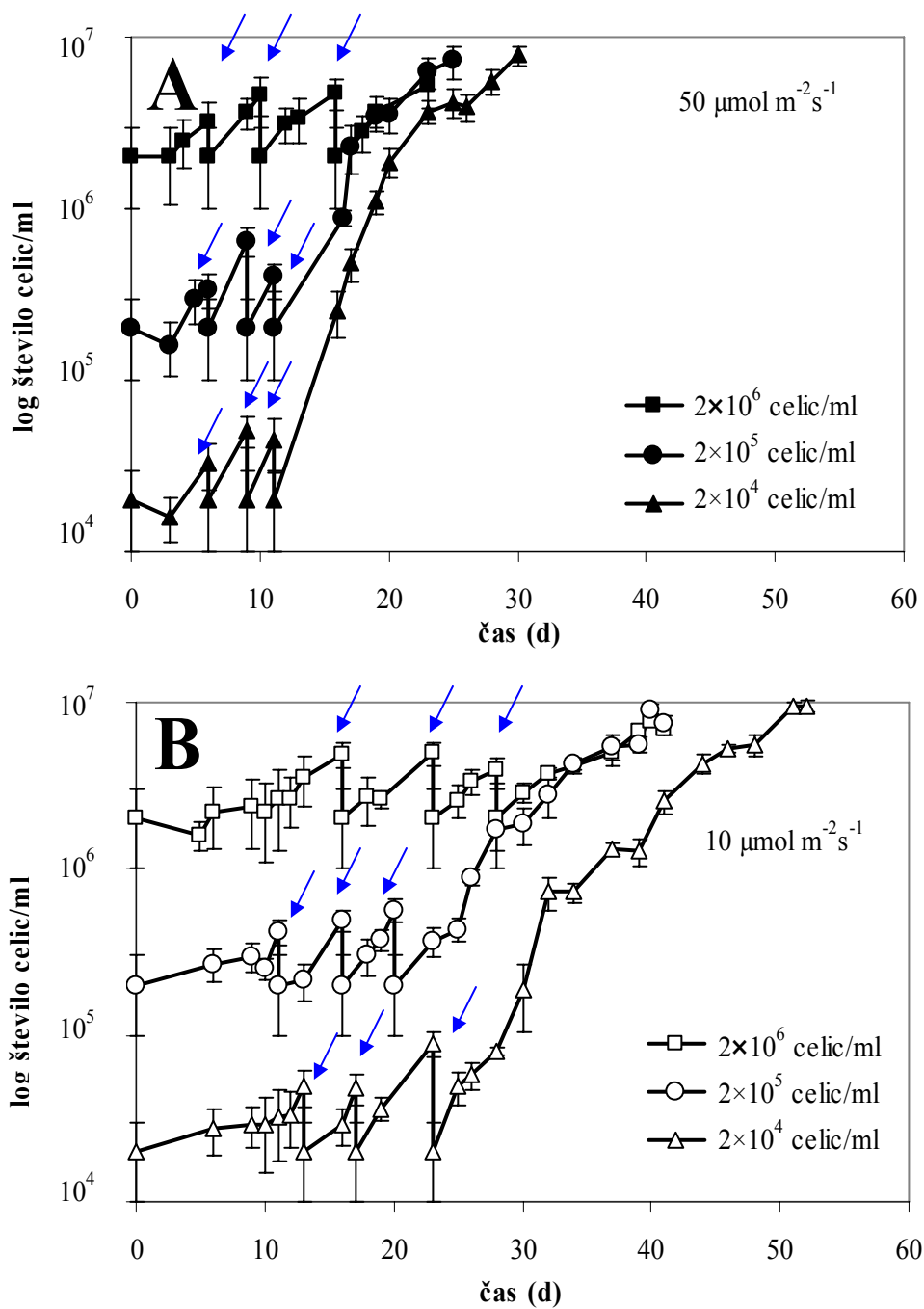
Slika 9: Razmerje med *in vivo* fluorescenca in številom celic/ml kulture *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB pri dveh različnih osvetlitvah; (A) fluorescenca fikocianinov (B) fluorescenca klorofila *a*. Prikazane so aritmetične sredine  $\pm$  SD. Izmerjenim vrednostim so dodane vrednosti  $R^2$  in trendne črte: polne črte za kulture, ki so rasle pri  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in prekinjene črte za kulture, ki so rasle pri  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



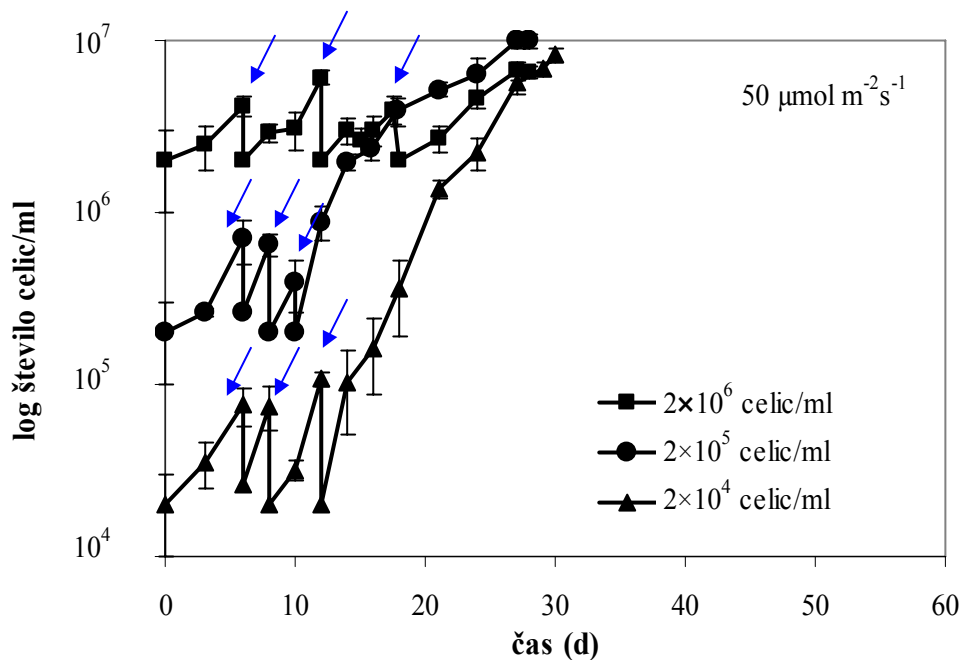
Slika 10: Razmerje med vsebnostjo fotosinteznih pigmentov, določeno z ekstrakcijo, in številom celic/ml kulture *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB pri dveh različnih osvetlitvah; (A) vsebnost fikocianinov, (B) vsebnost klorofila *a*. Prikazane so aritmetične sredine  $\pm$  SD. Izmerjenim vrednostim so dodane vrednosti  $R^2$  in trendne črte: polna črta za kulture ki so rasle pri  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in črtkana črta za kulture, ki so rasle pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



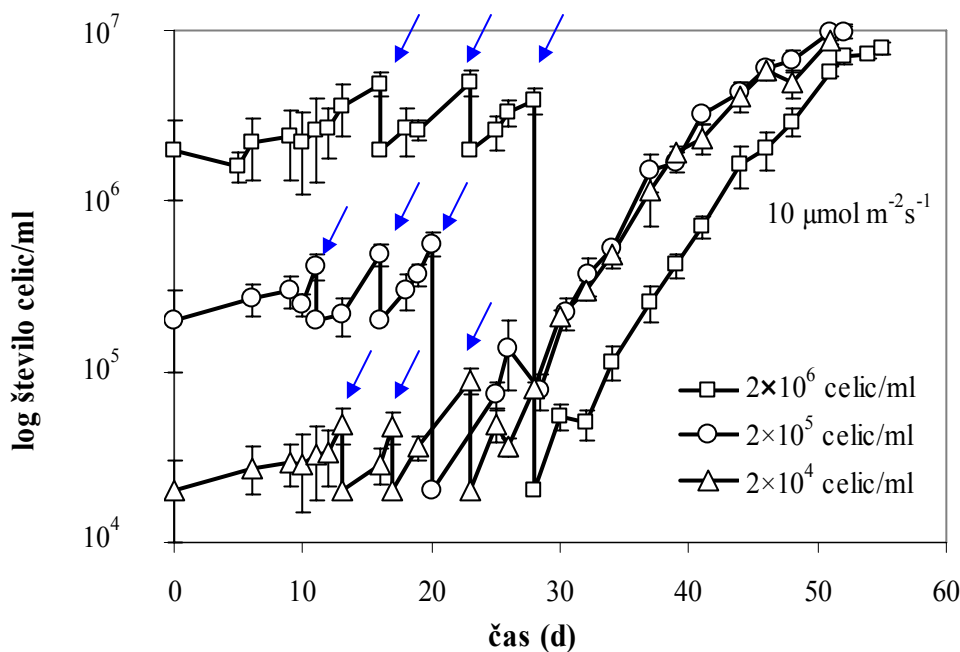
Slika 11: Razmerje med vsebnostjo fotosinteznih pigmentov, določeno z ekstrakcijo, in številom celic/ml kulture *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB pri dveh različnih osvetlitvah; (A) vsebnost fikocianinov (B) vsebnost klorofila *a*. Prikazane so aritmetične sredine  $\pm$  SD. Izmerjenim vrednostim so dodane vrednosti  $R^2$  in trendne črte: polne črte za kulture, ki so rasle pri  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in prekinjene črte za kulture, ki so rasle pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



Slika 12: Rastne krivulje seva *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB pri osvetlitvi (A)  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B)  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Trikotniki predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri nizki gostoti celic ( $2 \times 10^4$  celic/ml), krogi predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri srednji gostoti celic ( $2 \times 10^5$  celic/ml) in kvadrati predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri visoki gostoti celic ( $2 \times 10^6$  celic/ml). Puščice označujejo redčenja.

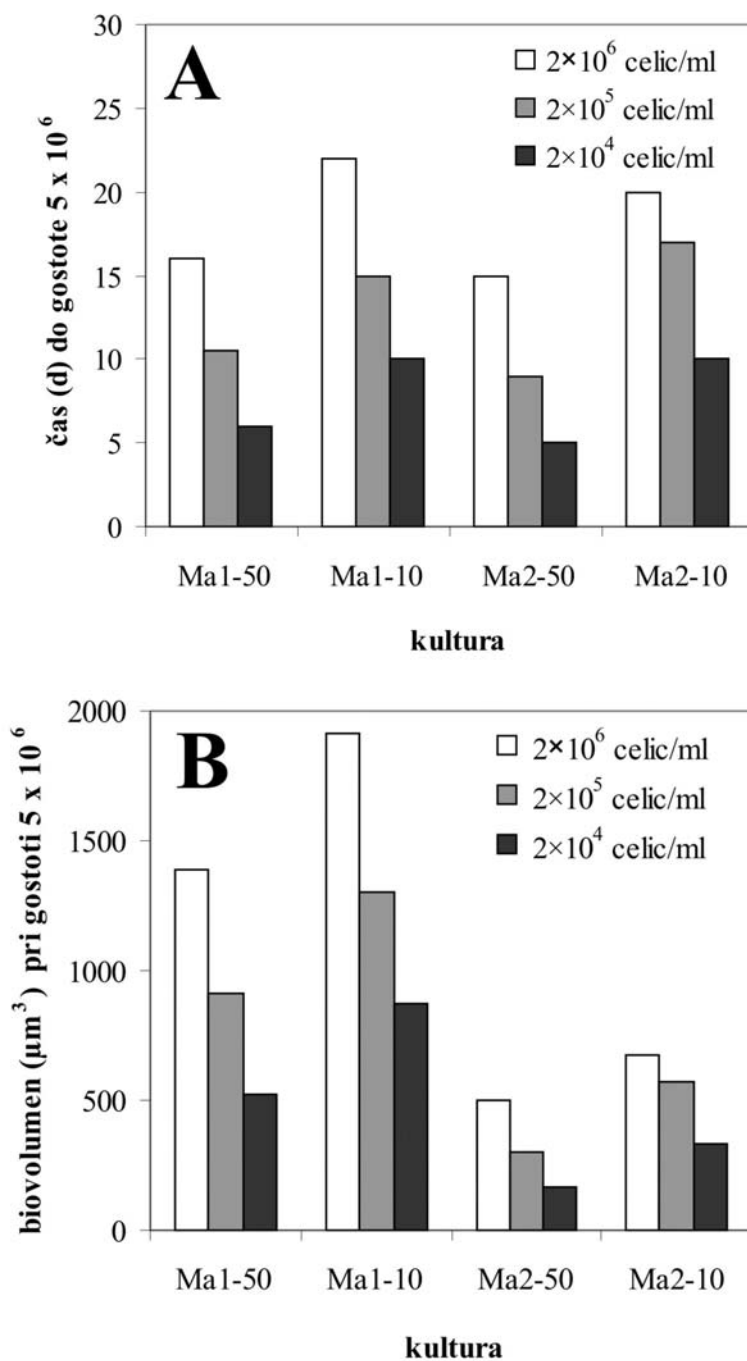


Slika 13: Rastne krivulje seva *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB pri osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Trikotniki predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri nizki gostoti celic ( $2 \times 10^4$  celic/ml), krogi predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri srednji gostoti celic ( $2 \times 10^5$  celic/ml) in kvadrati predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri visoki gostoti celic ( $2 \times 10^6$  celic/ml). Puščice označujejo redčenja.



Slika 14: Rastne krivulje seva *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Trikotniki predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri nizki gostoti celic ( $2 \times 10^4$  celic/ml), krogi predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri srednji gostoti celic ( $2 \times 10^5$  celic/ml) in kvadrati predstavljajo število celic, ki smo jih vzdrževali pri visoki gostoti celic ( $2 \times 10^6$  celic/ml). Puščice označujejo redčenja.





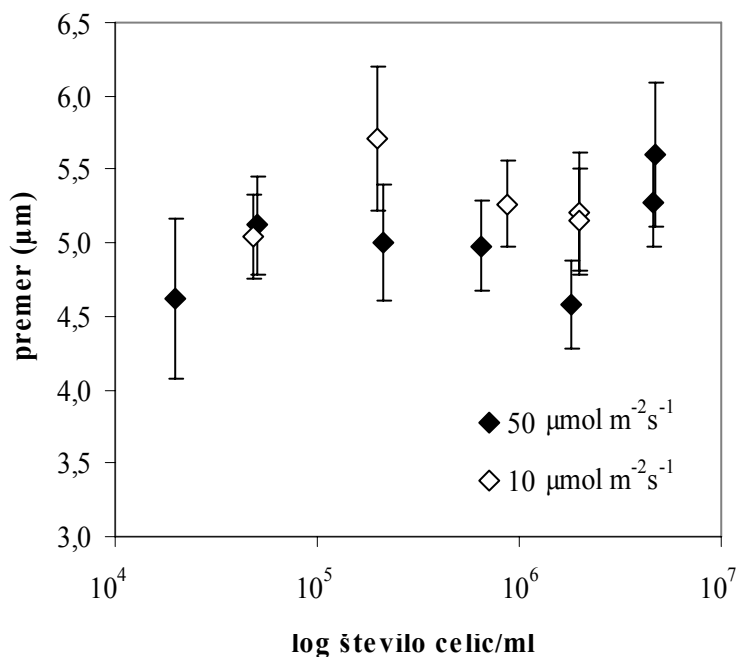
Slika 15: Kulturi *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB in Ma2-NIB pri osvetlitvah 10 in  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; (A) čas v dnevih, ki je potreben, da kulture po tretjem zaporednem redčenju spet dosežejo gostoto  $5 \times 10^6$  celic/ml in (B) povprečni biovolumen, ki ga dosežejo kulture v tem času. Črni stolpci predstavljajo izhodno redko kulturo ( $2 \times 10^4$  celic/ml), sivi stolpci predstavljajo izhodno srednje gosto kulturo ( $2 \times 10^5$  celic/ml) in beli stolpci predstavljajo izhodno gosto kulturo celic ( $2 \times 10^6$  celic/ml).

### 4.3.2 Vpliv gostote na volumen celic

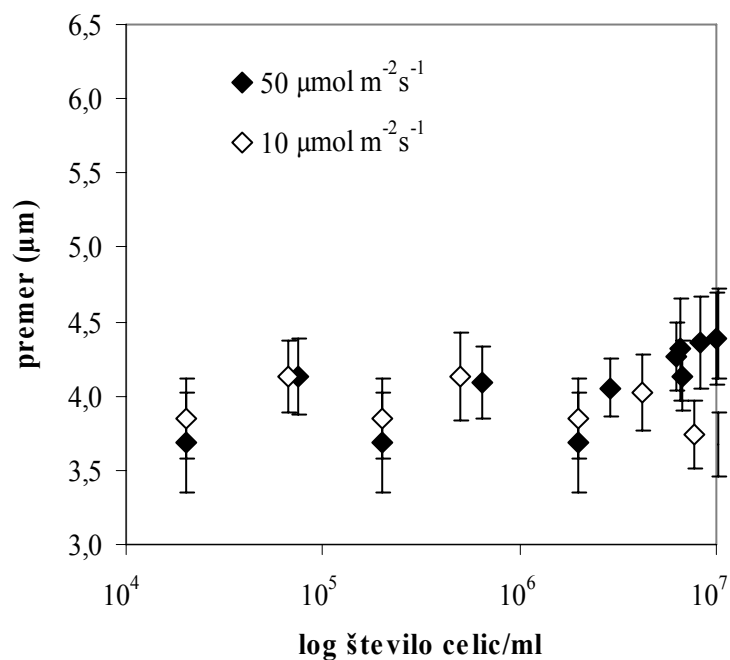
Premeri celic se med poskusom ne spreminjajo bistveno. Sev Ma1-NIB ima povprečni premer 5,5  $\mu\text{m}$ ; sev Ma2-NIB pa 4,0  $\mu\text{m}$ . Povprečni volumen celice Ma1-NIB je skoraj 3-krat večji od povprečnega volumna celice Ma2-NIB, zato doseže kultura Ma1-NIB veliko večji biovolumen pri podobni hitrosti delitve (Slika 15 B). Povprečni premer celic se ne spreminja bistveno glede na gostoto kulture, niti pri sevu Ma1-NIB (Slika 16) niti pri sevu Ma2-NIB (Slika 17). Premer celic, ki določa njihov volumen, prav tako ni odvisen od osvetlitve 10 in 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 4.3.3 Vpliv gostote na vsebnost in fluorescenco fotosinteznih pigmentov

Vsebnosti pigmentov in  $F$  na celico so prikazane v Preglednici 5. Če  $F$  preračunamo na celico, vidimo, da ima Ma1-NIB v povprečju 2,2-krat večjo vsebnost klorofila, 2,5-krat večjo vsebnost fikocianinov, 2,5-krat večjo  $F$  klorofila in 1,4-krat večjo  $F$  fikocianinov v primerjavi z Ma2-NIB.  $F$ , preračunana na  $\mu\text{m}^3$  celice Ma1-NIB se ne razlikuje statistično značilno od Ma2-NIB. Med gostimi ( $2 \times 10^6$  celic/ml), srednje gostimi ( $2 \times 10^5$  celic/ml) in redkimi kulturami ( $2 \times 10^4$  celic/ml) ni razlik v  $F$  na volumsko enoto celice. Pri osvetlitvi 10  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  je maksimalna vrednost  $F/\text{ml}$  za fikocianine čez 1000, za klorofil  $a$  pa manj kot 100 (Slika 18). Pri osvetlitvi 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  je maksimalna vrednost  $F/\text{ml}$  za fikocianine okoli 700, za klorofil  $a$  pa manj kot 70 (podatki niso prikazani). Kot vidimo je  $F$  fikocianinov v relativnih enotah na ml kulture je približno 10-krat večja od  $F$  klorofila (Slika 18 A, B).



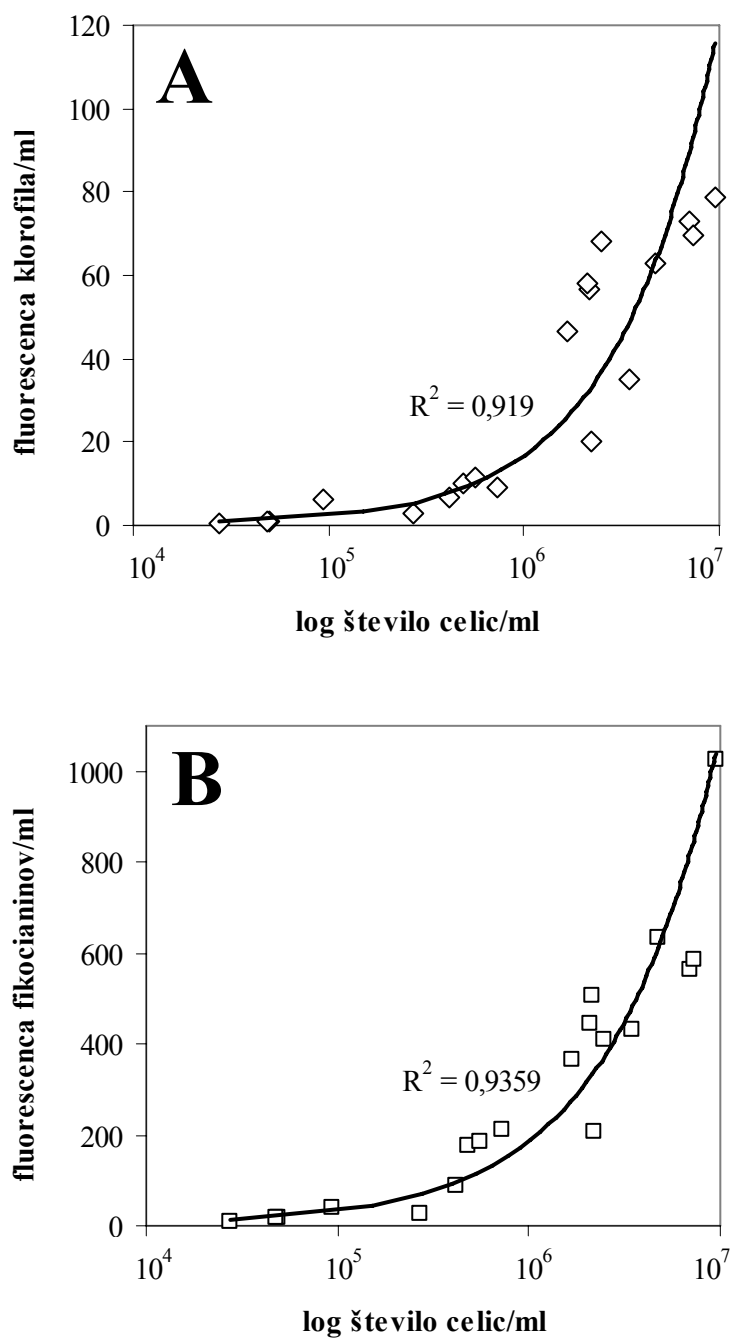
Slika 16: Povprečni premeri celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB v  $\mu\text{m}$  pri različnih koncentracijah celic. Abscisna os je prikazana logaritmsko.



Slika 17: Povprečni premeri celic *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB v µm pri različnih koncentracijah celic. Abscisna os je prikazana logaritemsko.

Preglednica 5: Preglednica vsebnosti (µg/celico), določenih z ekstrakcijo, in *in vivo* fluorescence (fluorescenca/celico) klorofila *a* ter fikocianinov za seva *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB in Ma2-NIB pri dveh različnih osvetlitvah. Prikazane so aritmetične sredine.

			osvetlitev	
			50 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	10 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
vsebnost pigmentov (µg/celico)	Ma1-NIB	klorofil <i>a</i>	5,8 × 10 <sup>-5</sup>	6,1 × 10 <sup>-5</sup>
		fikocianini	8,0 × 10 <sup>-5</sup>	8,5 × 10 <sup>-5</sup>
	Ma2-NIB	klorofil <i>a</i>	2,0 × 10 <sup>-5</sup>	4,0 × 10 <sup>-5</sup>
		fikocianini	2,5 × 10 <sup>-5</sup>	4,5 × 10 <sup>-5</sup>
fluorescenca pigmentov (F/celico)	Ma1-NIB	klorofil <i>a</i>	2,3 × 10 <sup>-5</sup>	2,0 × 10 <sup>-5</sup>
		fikocianini	18 × 10 <sup>-5</sup>	22 × 10 <sup>-5</sup>
	Ma2-NIB	klorofil <i>a</i>	0,9 × 10 <sup>-5</sup>	0,8 × 10 <sup>-5</sup>
		fikocianini	12 × 10 <sup>-5</sup>	17 × 10 <sup>-5</sup>



Slika 18: *In vivo* fluorescenca na mililiter kulture *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  pri različnih koncentracijah celic. (A) Fluorescenca klorofila *a* pri  $\lambda_{\text{ex}}$  440 in  $\lambda_{\text{em}}$  680 nm in (B) fluorescenca fikocianinov pri  $\lambda_{\text{ex}}$  620 in,  $\lambda_{\text{em}}$  645 nm. Dodane so trendne črte in vrednost  $R^2$ .

## 4.4 KOMPETICIJSKI POSKUSI

### 4.4.1 Hitrost delitve

Iz rezultatov ni mogoče zaključiti, da se hitrosti delitve mešanic bistveno razlikujejo od hitrosti delitve monokultur Ma1-NIB in Ma2-NIB. Razlike v hitrosti delitve so minimalne, tako pri osvetlitvi 50 kot pri 10  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Slika 19). V vsakem primeru pri mešanicah ne gre samo za aritmetični seštevek dveh različnih monokultur, temveč za drugačno kvaliteto vsote teh kultur.

### 4.4.2 Volumen celic

Ob primerjavi povprečnega volumna celic istega cianobakterijskega seva vidimo, da med celicami, ki so rastle pri osvetlitvi 10 in 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ni statistično značilnih razlik. Ob primerjavi povprečnega volumna mešanice opazimo, da volumen mešanice ni aritmetična sredina povprečnih volumnov monokultur (Slika 20). Mešanica obeh kultur ima na začetku poskusa veliko variabilnost volumnov, proti koncu poskusa pa se vrednosti povprečnih biovolumnov pomikajo proti večjim, zmanjša se tudi variabilnost (Slika 21).

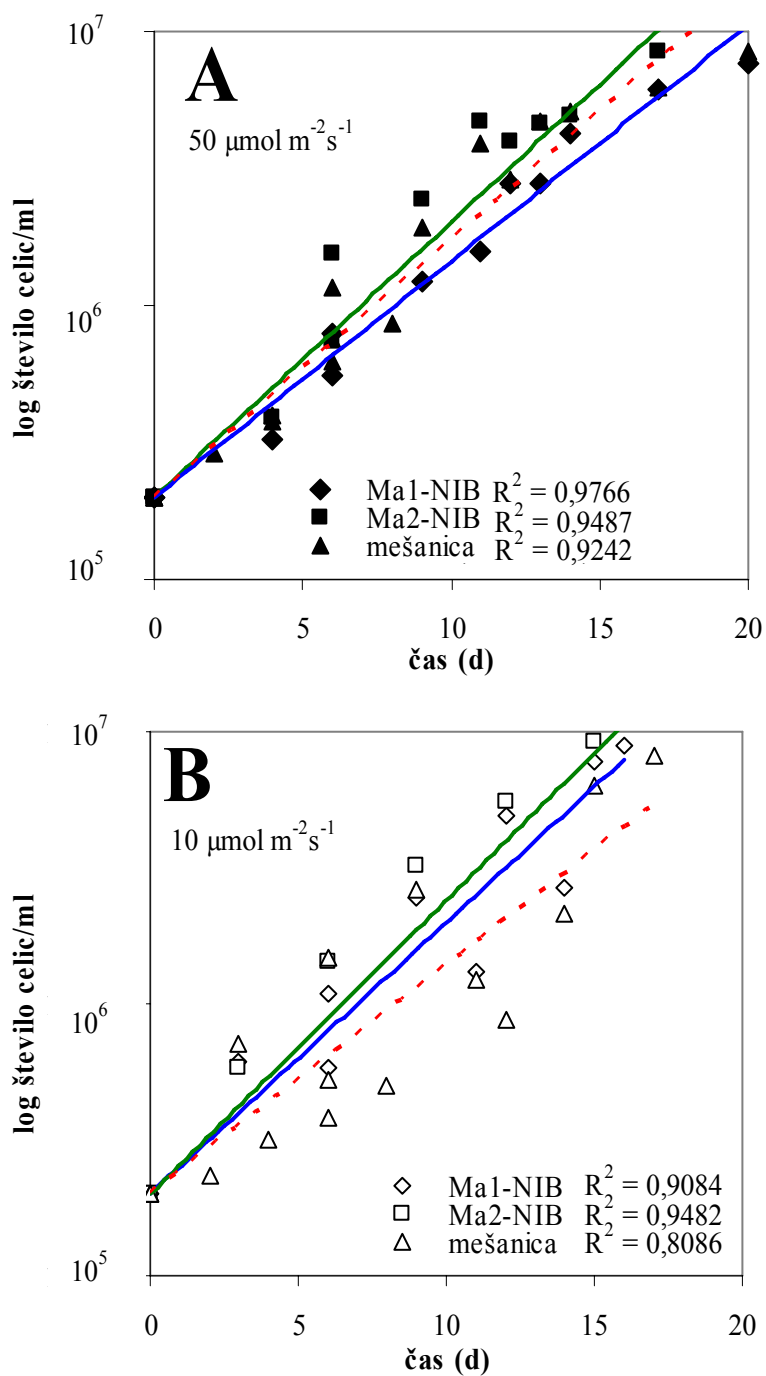
### 4.4.3 Vsebnost in fluorescenca fotosinteznih pigmentov

Pri osvetlitvi 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ima sev Ma2-NIB najmanjšo, sev Ma1-NIB pa največjo vsebnost klorofila *a* na celico (Slika 22 A). Mešanica je nekje vmes. Tudi pri 10  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ima najmanjšo vsebnost klorofila *a* na celico sev Ma2-NIB. Razlike v vsebnosti pigmentov na volumsko enoto celice ( $\mu\text{m}^3$ ) med Ma1-NIB, Ma2-NIB in mešanico niso statistično značilne;  $P > 0,3$  (Slika 22 B). Rezultati o vsebnosti pigmentov se ujemajo z rezultati *F* pigmentov.

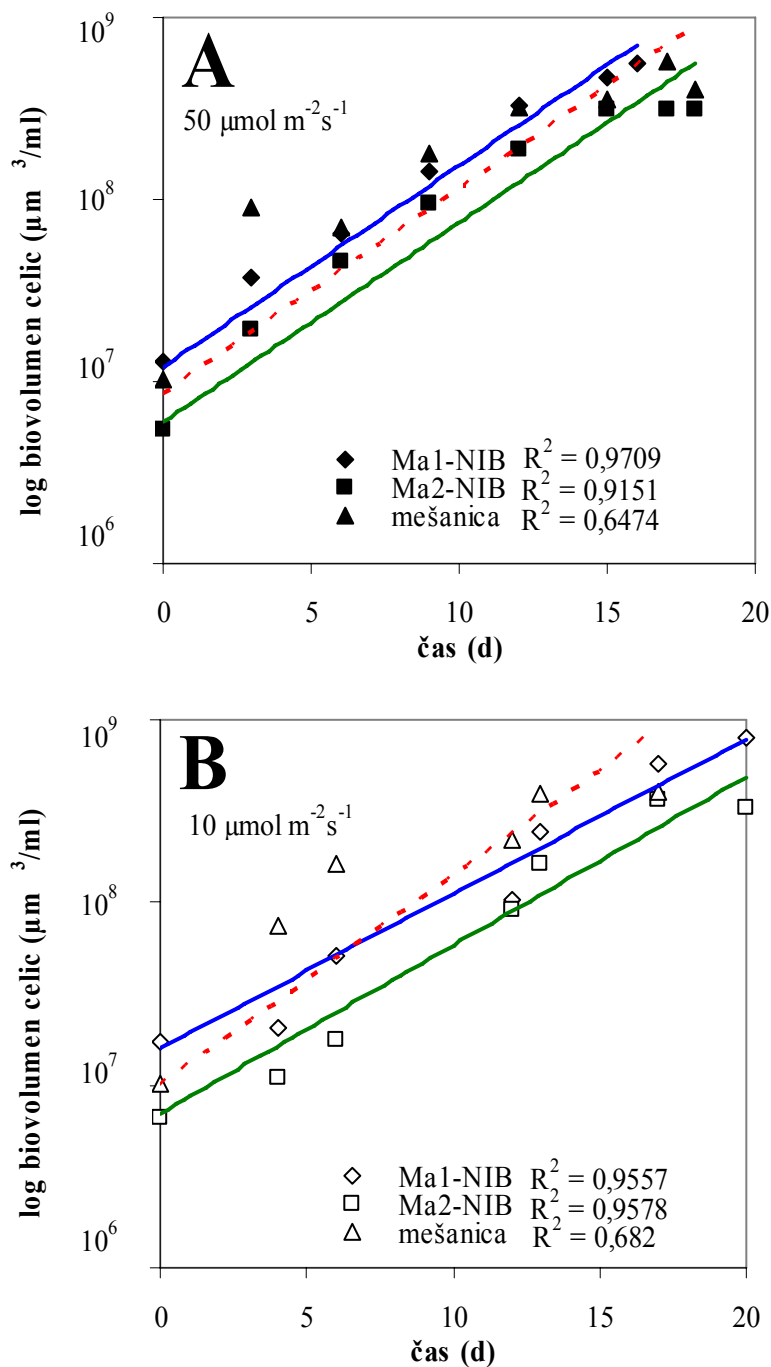
Pri 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ima sev Ma2-NIB najmanjšo *F*, sev Ma1-NIB pa največjo *F* fikocianinov in klorofila na celico, mešanica je nekje vmes (Slika 23 A). Tudi pri 10  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ima najmanjšo *F* na celico sev Ma2-NIB (Slika 23 B). Tudi *F* na volumsko enoto celice se, podobno kot vsebnost klorofila *a* na volumsko enoto, med sevi Ma1-NIB, Ma2-NIB in mešanicami ne razlikuje statistično značilno;  $P > 0,3$ . Zanimiva je primerjava izmerjenih vrednosti *F* na ml mešanice s teoretično izračunanimi vrednostmi ob predpostavki, da mešanico tvorita Ma1-NIB in Ma2-NIB v razmerju 50:50 % (Slika 24).

### 4.4.4 HPLC analize

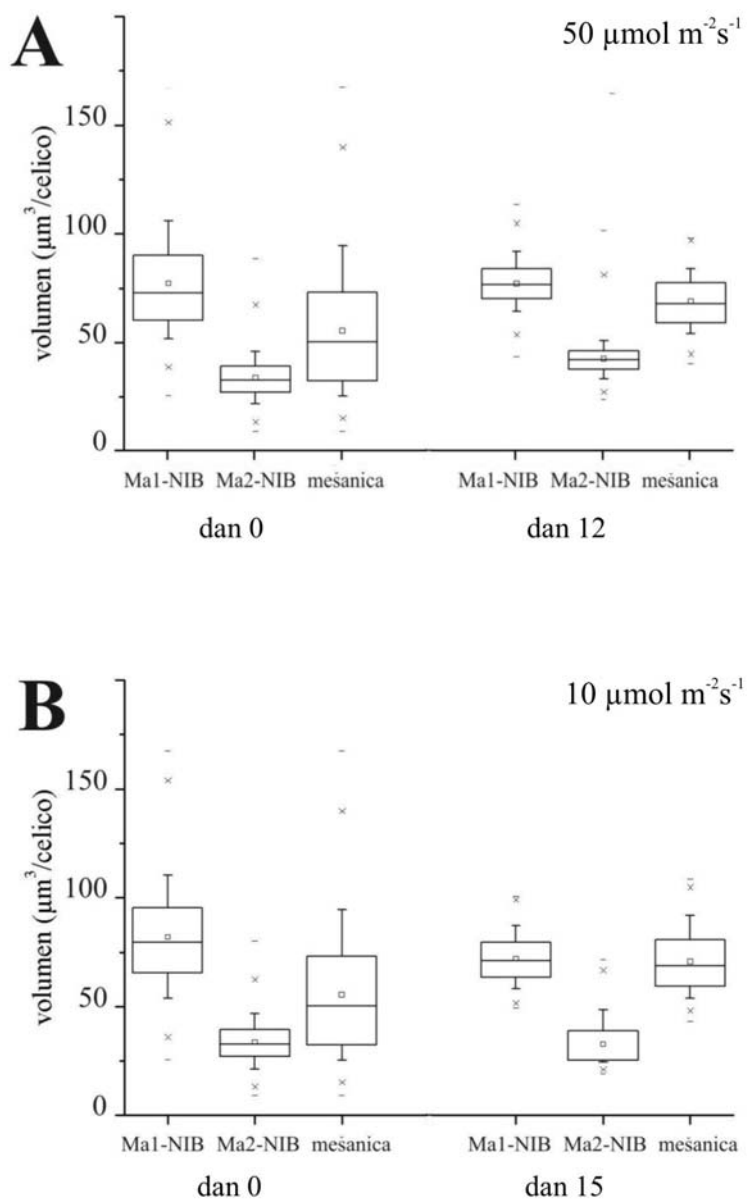
Z analizami supernatantov na HPLC smo potrdili rezultate dobljene na osnovi števila in velikosti celic ter njihove vsebnosti pigmentov in *F*. Tvorba MC v gosti monokulturi Ma1-NIB je pri osvetlitvi 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  znašala  $5,3 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g}$  MC na celico, pri 10  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  pa  $8,6 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g}$  MC na celico. Izkazalo se je, da mešanica Ma1-NIB in Ma2-NIB, ko z delitvami celic postaja gostejša, vsebuje vedno več večjih celic in celo preseže koncentracijo MC na celico, ki jo doseže v monokulturi. Medsebojni vpliv Ma1-NIB in Ma2-NIB se kaže tudi v proizvodnji MC (Slika 25).



Slika 19: Logaritmirane rastne krivulje glede na čas pri osvetlitvi (A)  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in (B)  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Rombi predstavljajo število celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati število Ma2-NIB, trikotniki pa število njune mešanice. Dodane so vrednosti  $R^2$  in trendne črte; modra za Ma1-NIB, zelena za Ma2-NIB in prekinjena rdeča za mešanico.

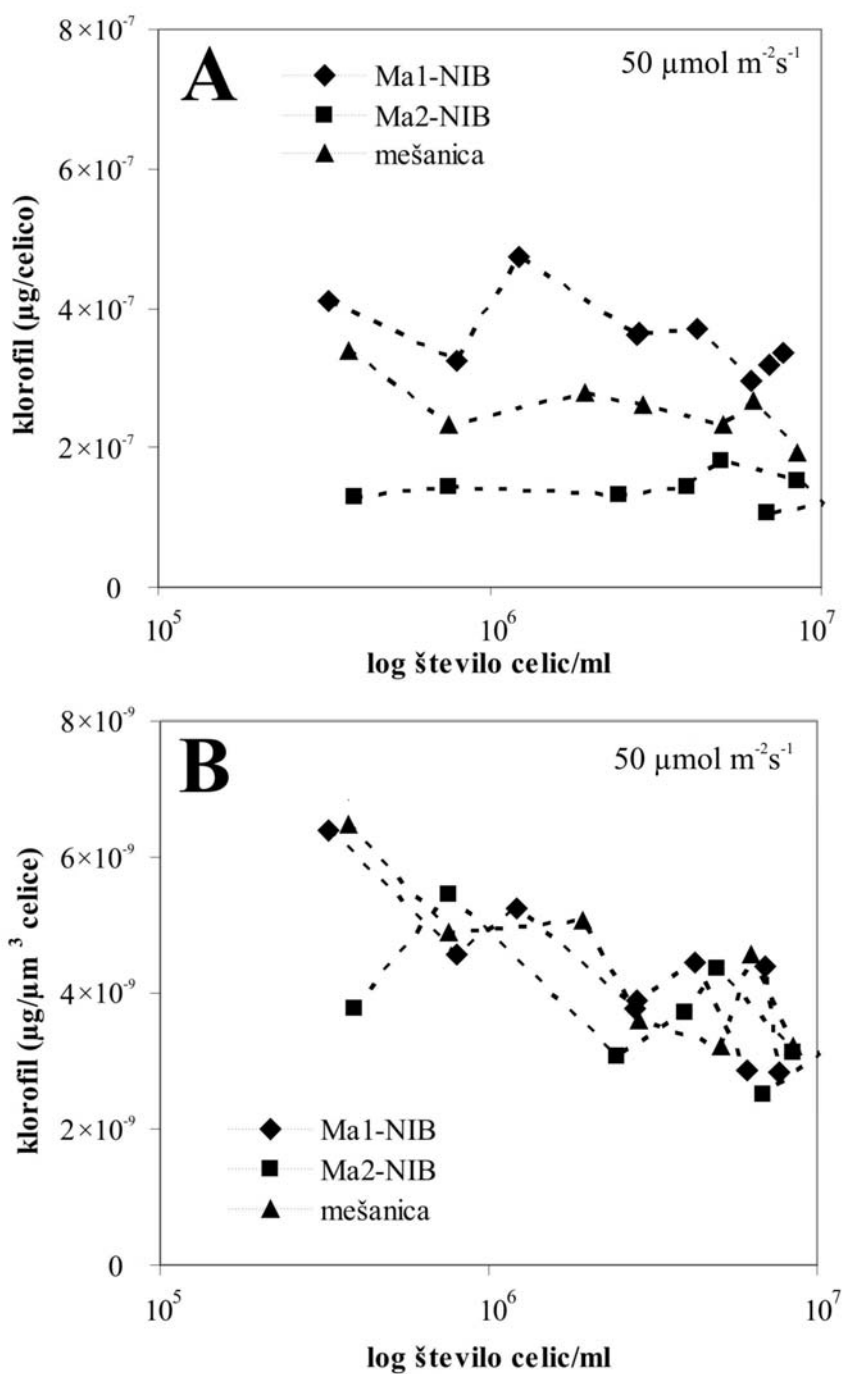


Slika 20: Biovolumen ( $\mu\text{m}^3/\text{ml}$ ) monokultur in njihovih mešanic glede na čas: (A) pri osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , (B) pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Rombi predstavljajo biovolumen celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati biovolumen Ma2-NIB, trikotniki pa biovolumen njune mešanice. Dodane so vrednosti  $R^2$  in trendne črte; modra za Ma1-NIB, zelena za Ma2-NIB in prekinjena rdeča za mešanico.

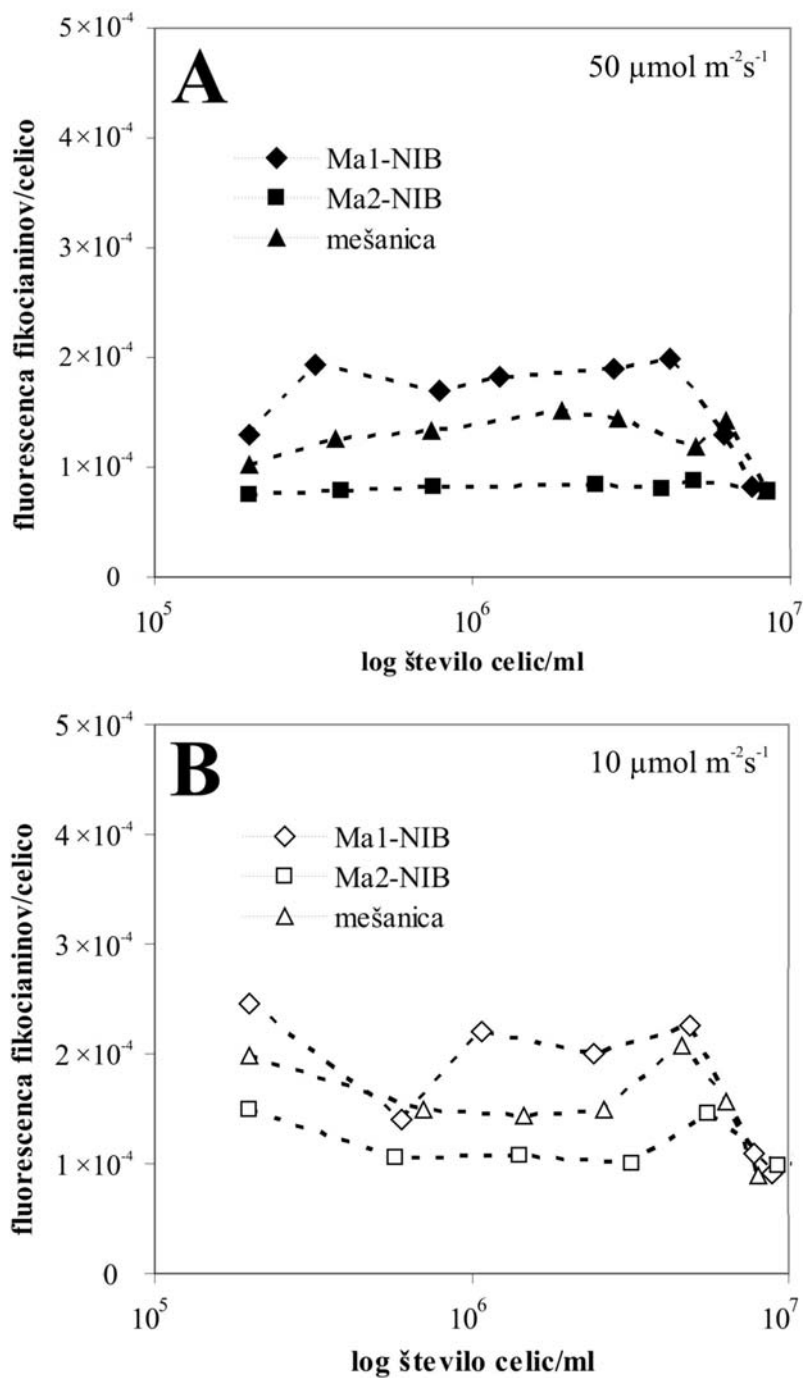


Slika 21: Biovolumen ( $\mu\text{m}^3/\text{celico}$ ) monokultur *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, Ma2-NIB in njihovih mešanic na začetku in na koncu poskusa: (A) pri osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B) pri osvetlitvi  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

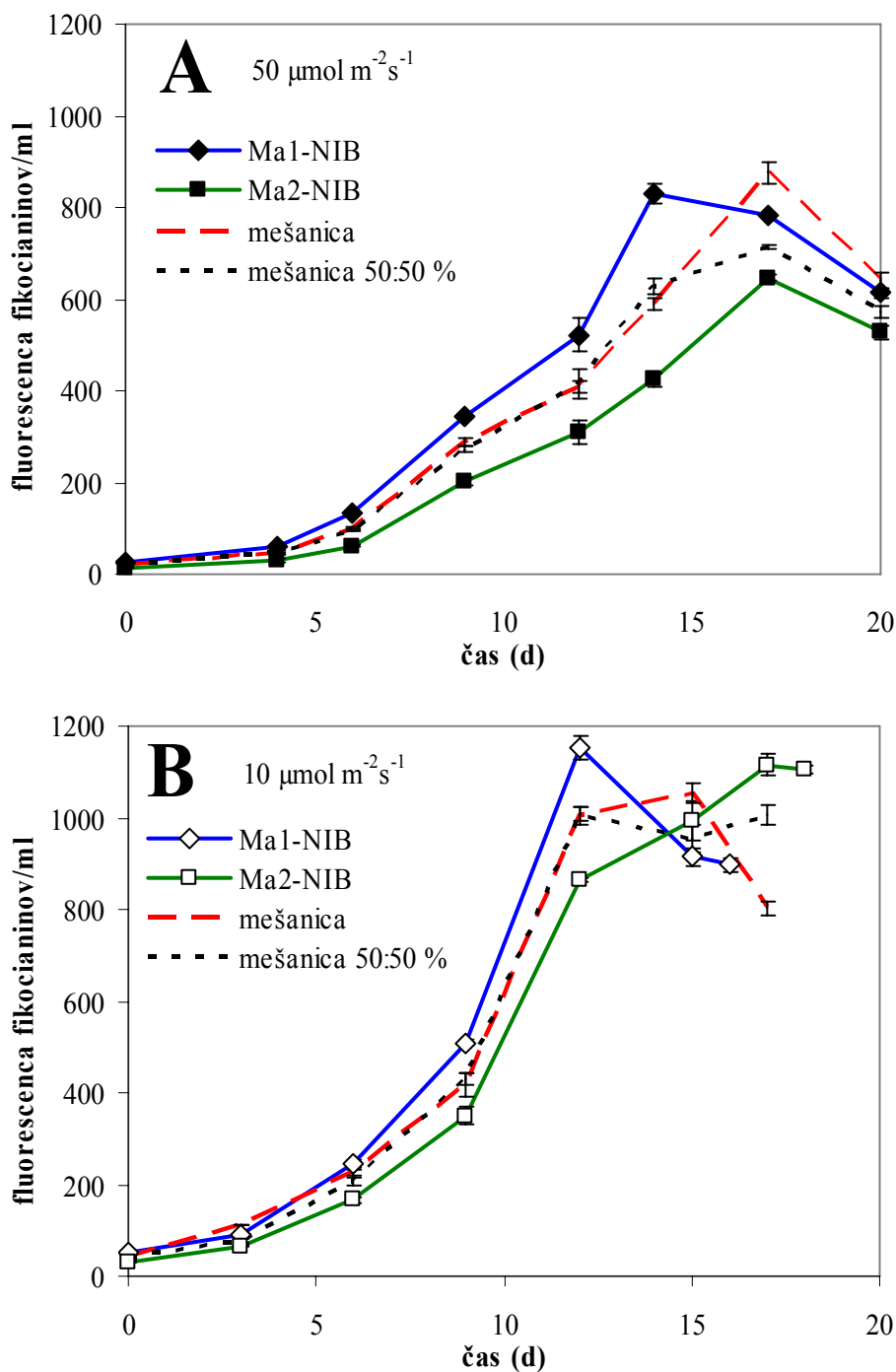




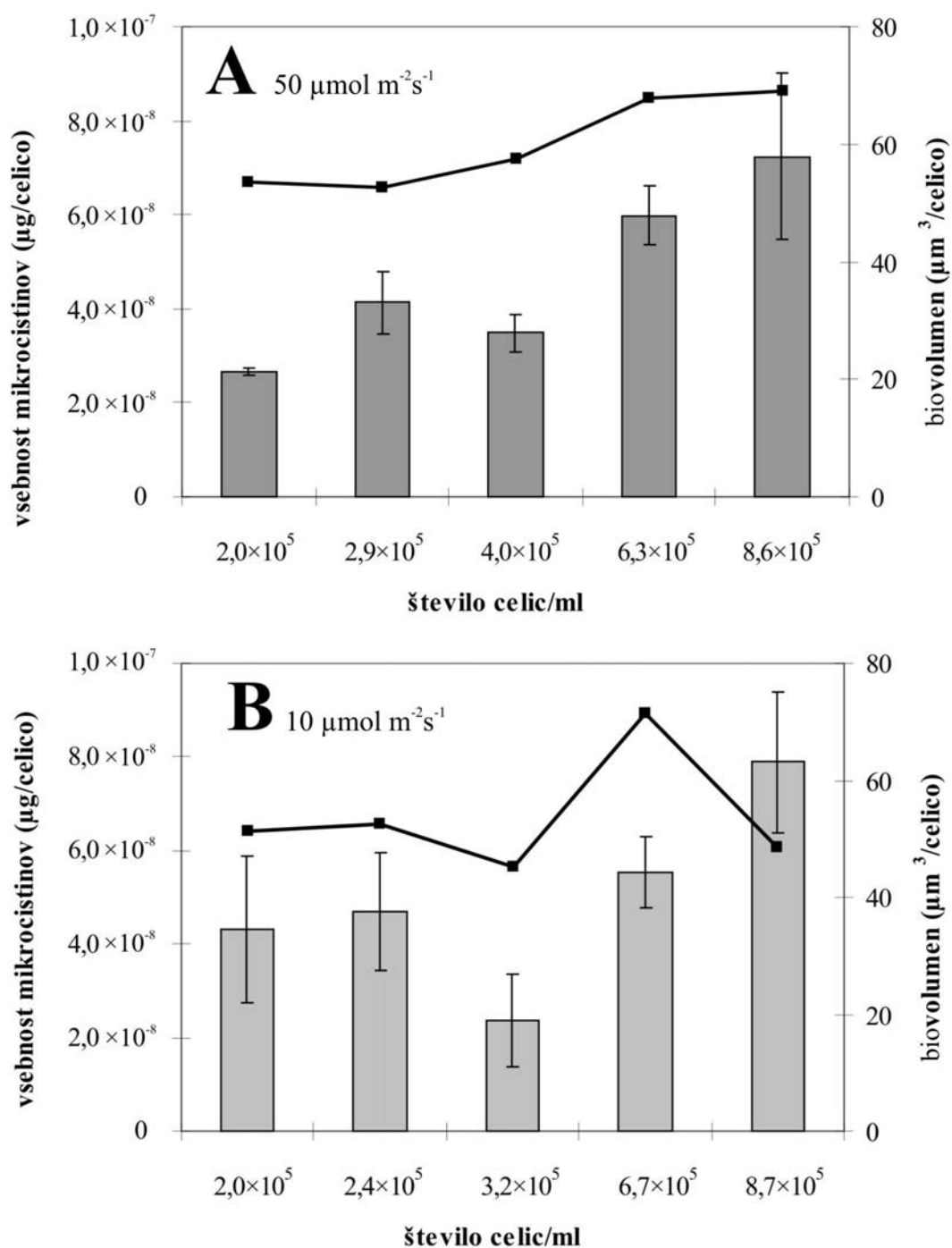
Slika 22: Vsebnost klorofila *a*, določena z ekstrakcijo, glede na koncentracijo celic, preračunana: (A) na celico, (B) na volumsko enoto celice. Rombi predstavljajo klorofil celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati klorofil celic *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB, trikotniki pa vsebnost klorofila mešanice pri osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



Slika 23: *In vivo* fluorescena fikocianinov v relativnih enotah na celico glede na koncentracijo celic pri osvetlitvi: (A)  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B)  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Rombi predstavljajo fluorescenco celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati fluorescenco *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB, trikotniki pa fluorescenco njune mešanice.



Slika 24: *In vivo* fluorescenca fikocianinov v relativnih enotah glede na čas pri osvetlitvi: (A)  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B)  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Rombi predstavljajo fluorescenca celic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, kvadrati fluorescenca *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB, fluorescenca mešanice predstavlja rdeča črta. Črna pikčasta črta predstavlja teoretično izračunano fluorescenca fikocianinov, s predpostavko, da oba seva v mešanici predstavljata 50 % celic.



Slika 25: Vsebnost mikrocestinov v  $\mu\text{g}/\text{celico}$  (stolpci, leva ordinata), določena s pomočjo HPLC iz ekstraktov mešanic *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB in Ma2-NIB ter mediane volumnov celic v  $\mu\text{m}^3/\text{celico}$  (črta, desna ordinata) glede na doseženo koncentracijo celic pri osvetlitvi (A)  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in (B)  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

## 4.5 VPLIV STRESNIH DEJAVNIKOV NA IZBRAN FITOPLANKTONSKE ORGANIZME

### 4.5.1 Vpliv stresnih dejavnikov na hitrost delitve

#### 4.5.1.1 Indukcija stresa s fizikalnimi dejavniki

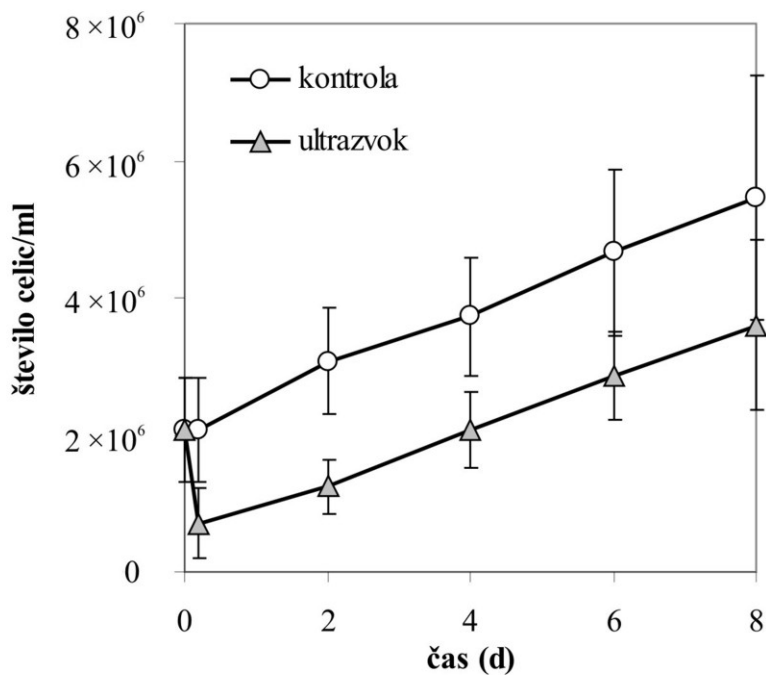
Izbrani fitoplanktonski organizmi so se na vse postopke odzvali z zmanjšano hitrostjo delitve, ponekod je prišlo tudi do lize celic, odvisno od stresnega postopka in dolžine učinkovanja. Obdelovanje celic z ultrazvokom je izmed izbranih snovi/postopkov edini postopek, ki ima na število celic takojšnje učinke. Število celic se takoj po obdelovanju z ultrazvokom statistično značilno zmanjša, vendar preživete celice vzpostavijo enako hitrost delitve kot kontrolne celice (Slika 26). Število celic se po obdelovanju s Tritonom X-100 od četrtega dne dalje zmanjšuje (Slika 27). Število celic zaradi obdelovanja z zamrzovanjem se zmanjša že prvi dan poskusa (Slika 29).

#### 4.5.1.2 Indukcija stresa s kemijskimi dejavniki

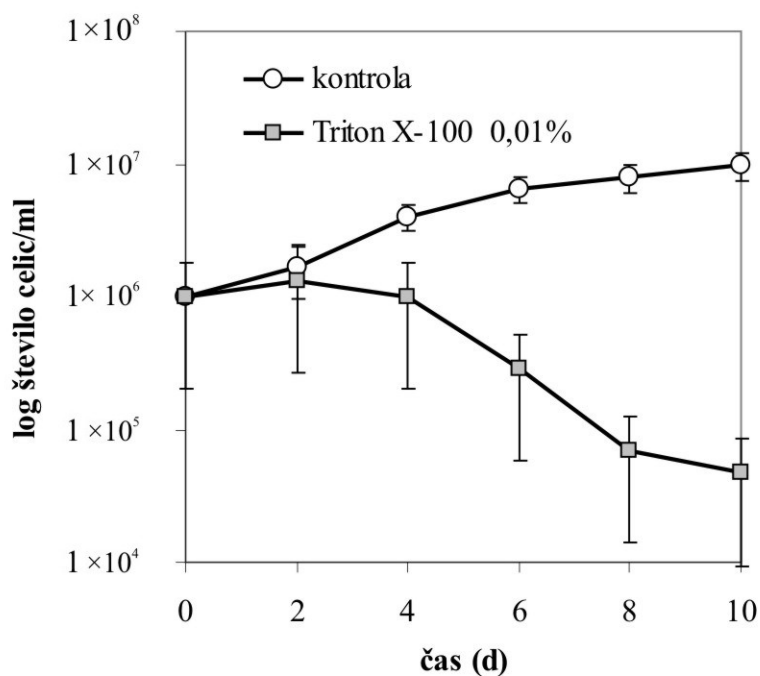
Izbrani fitoplanktonski organizmi so se na dodatek vseh snovi odzvali z zmanjšano hitrostjo delitve. Kako močno je bila delitev inhibirana je bilo odvisno od koncentracije izbrane snovi. Po dodatku inhibitorja dihanja KCN v koncentraciji 2 mM prihaja do lize celic Ma-NIB (Slika 28). Po dodatku inhibitorja fotosinteze DCMU v koncentraciji 10  $\mu$ M pride do zakasnitve proliferacije celic (Slika 28). Vpliv bacitracina (4 in 20 enot) smo preizkušali na sevih Ma2-NIB in Ma4-NIB; pri obeh je prišlo do zmanjšanja hitrosti delitve (podatki niso prikazani).

#### 4.5.1.3 Indukcija stresa s kombinacijo fizikalnih in kemijskih dejavnikov

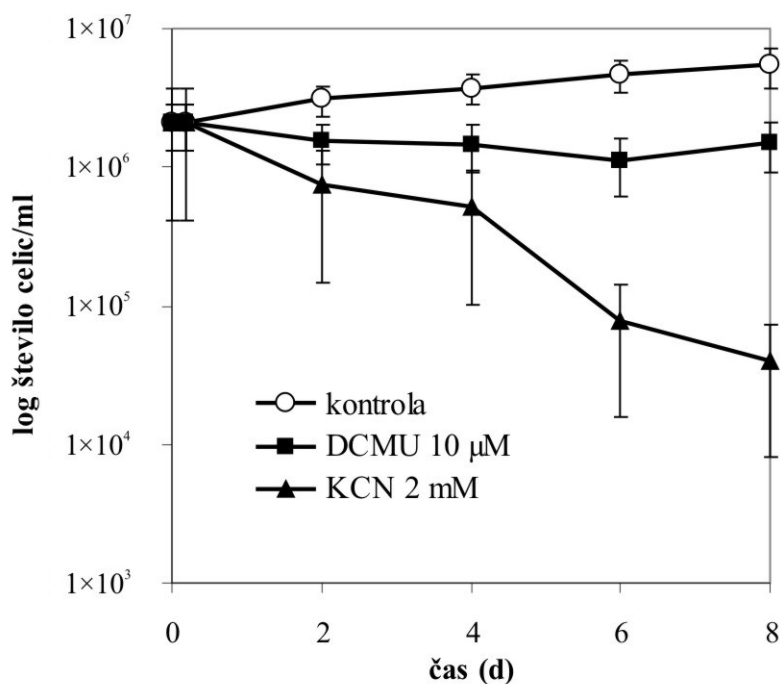
Zamrzovanje v povezavi z dodatkom DCMU ima večji vpliv na zmanjšanje števila celic kot samo zamrzovanje ali sam dodatek DCMU. Zamrzovanje v povezavi z dodatkom DCMU povzroči lizo celic, medtem ko obdelovanje s posameznim stresnim dejavnikom povzroči lizo celic le prvi dan, potem se število celic ohranja (Slika 29).



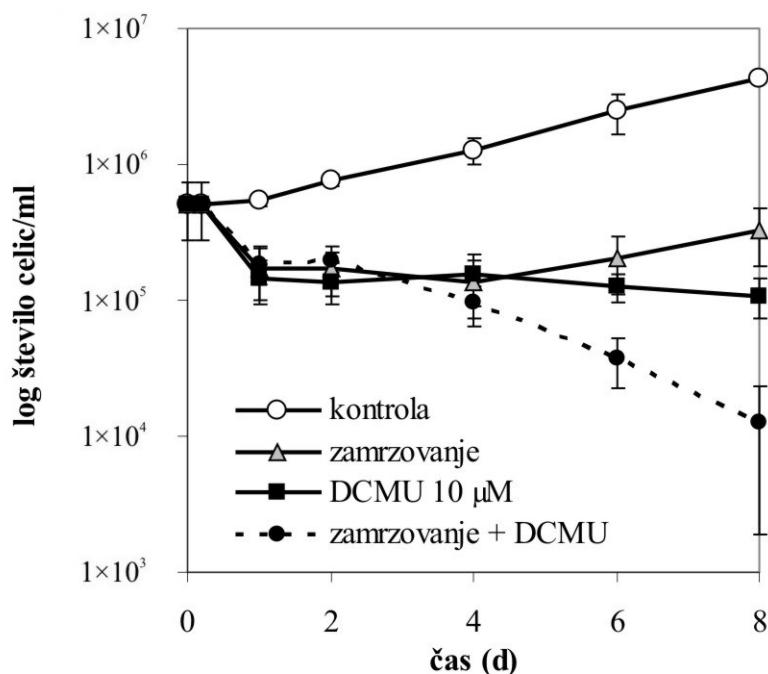
Slika 26: Rastne krivulje kulture *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB, ki je bila izpostavljena ultrazvoku. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki število celic po obdelavi z ultrazvokom (volumen 5 ml, obdelovanje 5 min).



Slika 27: Logaritmirane rastne krivulje kulture *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB, ki je bila izpostavljena Tritonu X-100. Krogi predstavljajo kontrolo in kvadrati število celic po dodatku Tritona X-100 v končni koncentraciji 0,01 %.



Slika 28: Logaritmirane rastne krivulje kulture *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB, ki je bila izpostavljena inhibitorju fotosinteze - DCMU in dihanja - KCN. Krogi predstavljajo kontrolo, kvadrati rast celic po dodatku DCMU v končni koncentraciji 10  $\mu$ M in trikotniki rast celic po dodatku KCN v končni koncentraciji 2 mM.



Slika 29: Logaritmirane rastne krivulje kulture *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB, ki je bila izpostavljena zamrzovanju in dodatku DCMU. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki rast celic po zamrzovanju, kvadrati rast celic po dodatku DCMU v končni koncentraciji 10  $\mu$ M in črni krogi rast celic po obdelavi z zamrzovanjem in dodatku DCMU v končni koncentraciji 10  $\mu$ M.

## 4.5.2 Vpliv stresnih dejavnikov na fluorescenco pigmentov

S pomočjo DCMU smo locirali  $\lambda_{em}$  FS II na spektru valovnih dolžin 600–730 nm. Za dobro viden vrh FS II so za različne fitoplanktonske organizme potrebne različne  $\lambda_{ex}$ . Izkazalo se je, da je za cianobakterije najbolj primerna  $\lambda_{ex}$  440 nm, za zelene alge pa  $\lambda_{ex}$  480 nm. Pomembna parametra  $F$  sta:  $F_0$  – osnovna  $F$ , ki pri cianobakterijah zaradi fikobilisomskih struktur kaže veliko variabilnost v intenziteti  $F$ , in  $F_M$  – maksimalna  $F$  (Campbell *in sod.*, 1998). Iz naših poskusov dobljeni parametri  $F$  na celico so:

- Sq-NIB :  $F_0 = 5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$ ,  $F_M = 1,8 \times 10^{-4} - 2,5 \times 10^{-4}$ ,
- Ma1-NIB in Ma2-NIB:  $F_0 = 7 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-6}$ ,  $F_M = 9,0 \times 10^{-6} - 1,4 \times 10^{-5}$ .

Ugotovili smo, da centrifugiranje kultur (4000 obratov/min) ne vpliva na  $F$  cianobakterij, saj so meritve  $F$  pred in po centrifugiranju kultur, enake. Prav tako so centrifugirane kulture cianobakterij enako občutljive na dodatek DCMU kot necentrifugirane kulture (podatki niso prikazani).

### 4.5.2.1 Indukcija stresa s fizikalnimi dejavniki

Za merjenje  $F$  smo uporabljali tisti čas učinkovanja, ki je povzročil zmanjšano hitrost delitve izbranih fitoplanktonskih celic. Pri vseh postopkih, ki vplivajo na delitve/lizo fitoplanktonskih organizmov, je prišlo tudi do povečanja  $F$  na celico (Preglednica 6).

Obdelovanje z ultrazvokom povzroči v cianobakterijskem sevu Ma-NIB povečano  $F$  klorofila  $a$  na celico (Slika 30) in  $F$  fikocianinov na celico (Slika 31). Kadar celice pred dodatkom DCMU, KCN ali PP obdelamo z ultrazvokom, se učinek teh snovi na fitoplanktonske organizme ne poveča (podatki niso prikazani).

Triton X-100 s svojim detergenskim delovanjem tudi vpliva na  $F$  seva Ma2-NIB z dvigom  $F$  klorofila v obeh fotosistemih (Slika 32), kot tudi z dvigom  $F$  fikocianinov na celico (Slika 33).

### 4.5.2.2 Indukcija stresa s kemijskimi dejavniki

Za merjenje  $F$  smo uporabljali tiste koncentracije snovi, ki so povzročile zmanjšano hitrost delitve izbranih fitoplanktonskih organizmov. Pri vseh snoveh, ki vplivajo na delitve/lizo fitoplanktonskih organizmov, je prišlo tudi do povečanja  $F$  na celico (Preglednica 6).

KCN v treh različnih koncentracijah poveča  $F$  na celico pri sevu Ma-NIB; do največjega povečanja pride pri dodatku najvišje koncentracije KCN. Poveča tako  $F$  klorofila  $a$  v obeh fotosistemih (Slika 34) kot  $F$  fikocianinov na celico (Slika 35). Prav tako DCMU poveča  $F$  klorofila  $a$  v obeh fotosistemih in  $F$  fikocianinov na celico pri sevu Ma2-NIB. Zanimiva je primerjava delovanja KCN in DCMU na sev Ma-NIB. KCN v končni koncentraciji 2 mM poviša  $F$  klorofila na celico (Slika 36) in fikocianinov na celico (Slika 37) veliko bolj kot DCMU, čeprav tudi DCMU poviša  $F$  klorofila na celico (Slika 36) in  $F$  fikocianinov na celico (Slika 37) v primerjavi s kontrolo. Velikost vpliva stresnih dejavnikov se razlikuje glede na izbrani sev cianobakterij.



Antibiotik bacitracin pri sevu cianobakterije Ma2-NIB povzroči tudi dvig *F* na celico v fotosistemih I in II (Slika 38) in dvig *F* fikocianinov na celico (Slika 39).

Vplive KCN na Ma-NIB smo merili ločeno in skupaj z dodatkom PP. Opazili smo povečano *F* klorofila na celico (Slika 40) in *F* fikocianinov na celico (Slika 41). Kombinacija KCN in PP četrty in šesti dan poskusa bolj poveča *F* klorofila kot sam PP ali KCN, medtem ko je povečana *F* klorofila drugi dan enaka pri dodatku PP ali dodatku kombinacije KCN in PP.

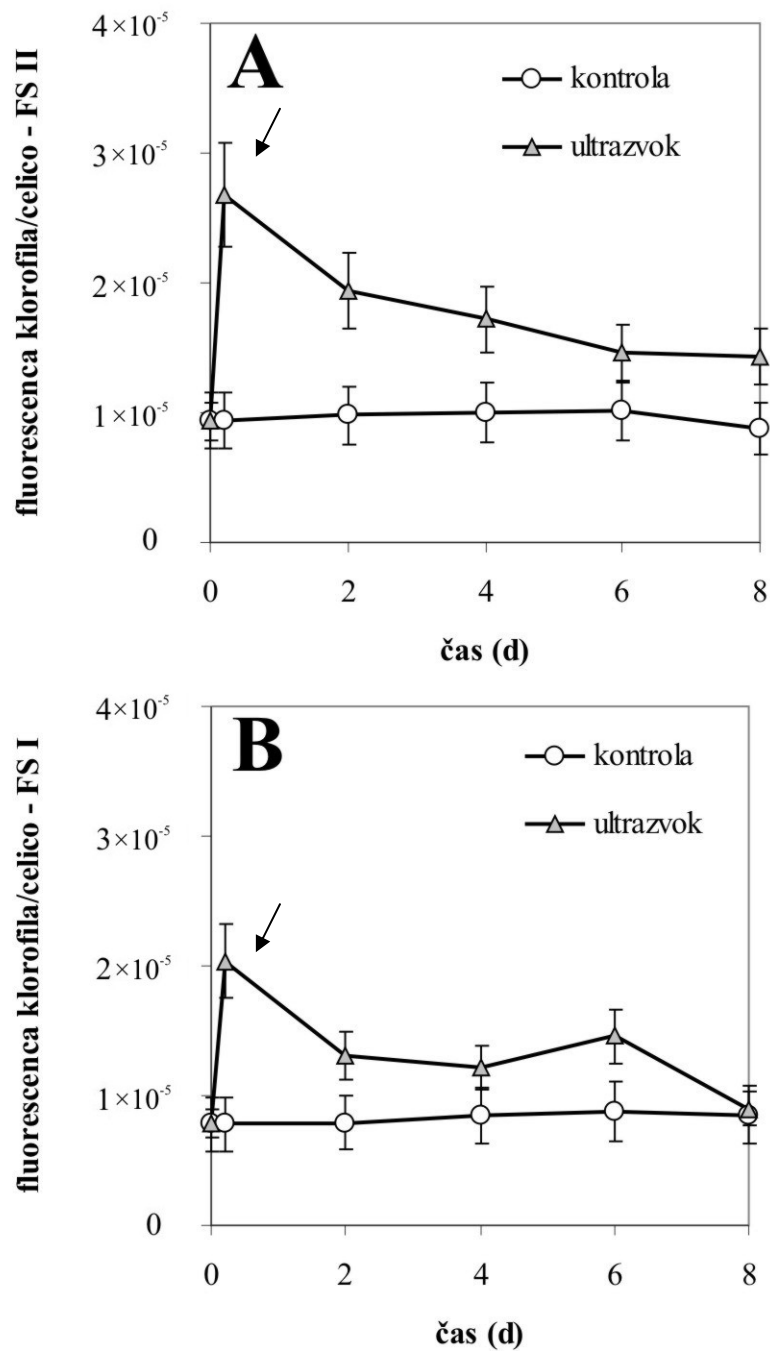
#### 4.5.2.3 Indukcija stresa s kombinacijo fizikalnih in kemijskih dejavnikov

Zamrzovanje na sev Ma2-NIB ne vpliva tako močno kot DCMU. Največji vpliv ima kombinacija zamrzovanja in DCMU. Pride do povečanja *F* klorofila na celico (Slika 42) in *F* fikocianina na celico (Slika 43).

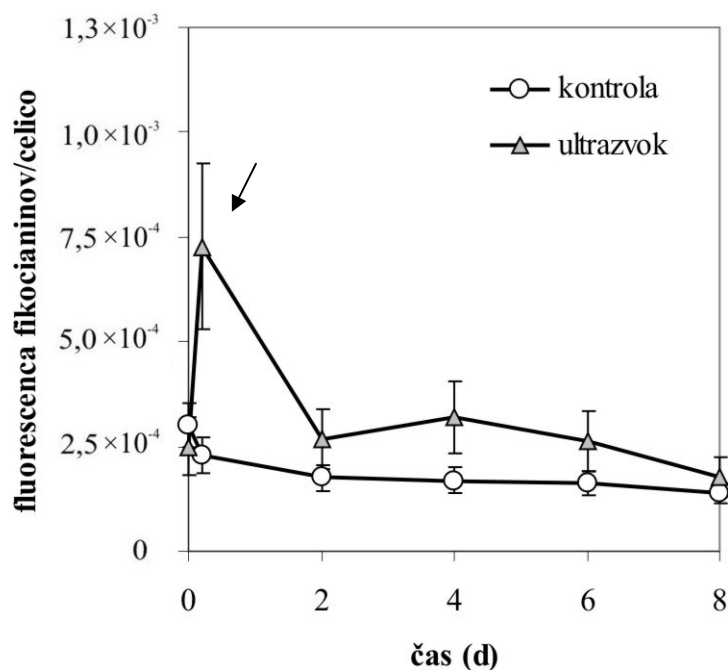
Preglednica 6: *In vivo* fluorescenca (*F*) fotosinteznih pigmentov kulture cianobakterije *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB, ki smo jo izpostavili različnim stresnim dejavnikom. V preglednici prikazane številke povedo kolikokrat je *F* na celico obdelane kulture večja od kontrole šesti dan poskusa. V drugem, tretjem in petem stolpcu so prikazane povprečne vrednosti *F*, v četrtem pa kvocient *F* FS II/FS I  $\pm$  SD.

snov/postopek	<i>F</i> klorofila, $\lambda_{ex}$ 440 nm		FS II/FS I	<i>F</i> fikocianinov, $\lambda_{ex}$ 620 nm
	$\lambda_{em}$ 680 nm (FS II)	$\lambda_{em}$ 730 nm (FS I)		$\lambda_{em}$ 645 nm
<b>kontrola</b>	1	1	1 $\pm$ 0,3	1
<b>Triton X-100 (0,01 %)</b>	5 $\times$	4 $\times$	1 $\pm$ 0,1	5 $\times$
<b>* ultrazvok (5 ml, 5 min)</b>	1,4 $\times$	1,7 $\times$	1 $\pm$ 0,3	2 $\times$
<b>zamrzovanje (2 h, -20 °C)</b>	1,8 $\times$	2,1 $\times$	1 $\pm$ 0,3	2 $\times$
<b>*** DCMU (10 <math>\mu</math>M)</b>	18 $\times$	23 $\times$	1 $\pm$ 0,3	6 $\times$
<b>* KCN (2 mM)</b>	25 $\times$	30 $\times$	1 $\pm$ 0,3	40 $\times$
<b>** bacitracin (20 enot)</b>	7,5 $\times$	8 $\times$	1 $\pm$ 0,3	21 $\times$
<b>DCMU + zamrzovanje</b>	17 $\times$	29 $\times$	0,6 $\pm$ 0,3	20 $\times$
<b>MC-LR (10<sup>-6</sup> M)</b>	143 $\times$	144 $\times$	1 $\pm$ 0,3	257 $\times$
<b>PP BL1125 (10<sup>-6</sup> M)</b>	313 $\times$	310 $\times$	1 $\pm$ 0,3	509 $\times$
<b>AnP B (10<sup>-6</sup> M)</b>	13 $\times$	18 $\times$	1 $\pm$ 0,3	14 $\times$

\* podatki se nanašajo na sev *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB  
 \*\* podatki se nanašajo na tretji dan poskusa  
 \*\*\* DCMU ima tudi hitri vpliv na *F*



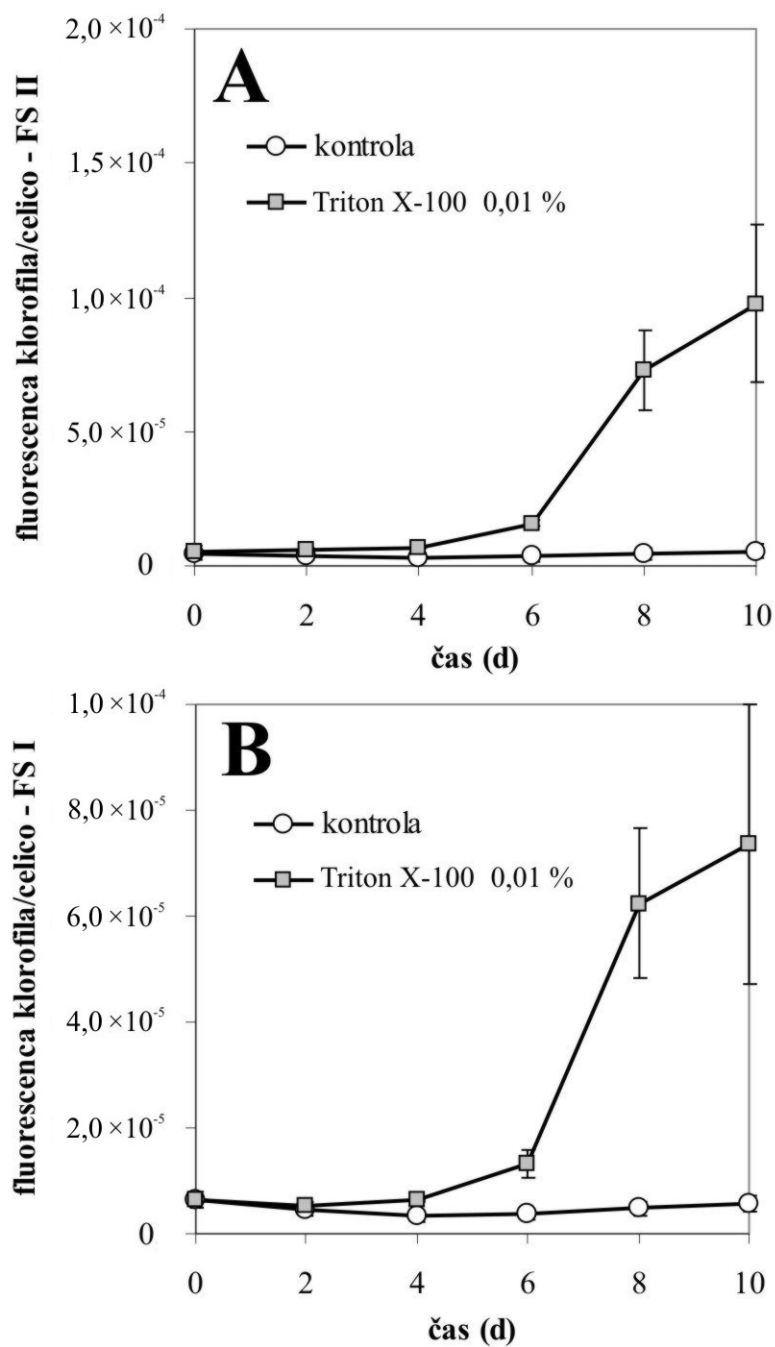
Slika 30: Vpliv ultrazvoka na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki pa vpliv ultrazvoka glede na čas. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence.



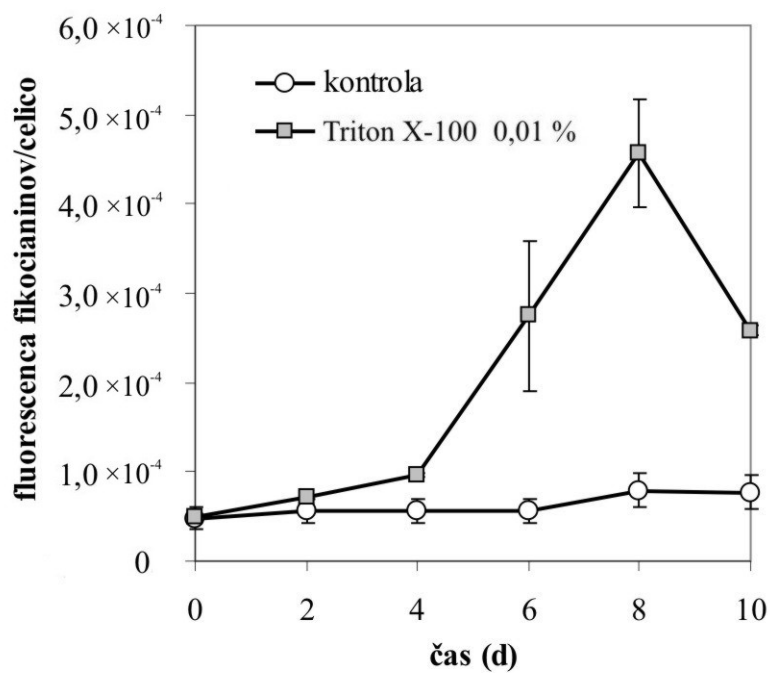
Slika 31: Vpliv ultrazvoka na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki pa vpliv ultrazvoka glede na čas. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence.

Vpliv stresnih dejavnikov na povečano  $F$  na celico je zelo časovno variabilen, vplivi nekaterih stresnih dejavnikov so vidni že po nekaj sekundah, drugi potrebujejo za opazen vpliv več dni. Hitre oz. trenutne vplive, v intervalu nekaj sekund do nekaj minut, smo opazili ob dodatku DCMU. Pri cianobakterijah je prišlo do povečanja  $F$  FS II in relativno majhnega zmanjšanja  $F$  FS I, zato se sprememba odraža tudi na razmerju razmerja  $F$  FS II/FS I, ki je za sev Ma2-NIB znašalo  $2 \pm 0,5$ . Pri zeleni algi Sq-NIB je prišlo do povečanja  $F$  FS II in zmanjšanja  $F$  FS I, zato je vpliv na razmerje še bolj izrazit,  $6 \pm 2$ . Zaradi dodatka DCMU pride tudi do zakasnenih vplivov, ki se pri cianobakterijah izražajo s sočasnim povečanjem  $F$  FS II in FS I, zato vpliv na razmerje  $F$  FS II/FS I ni viden (Preglednica 6, Slike 36, 37, 42 in 43).

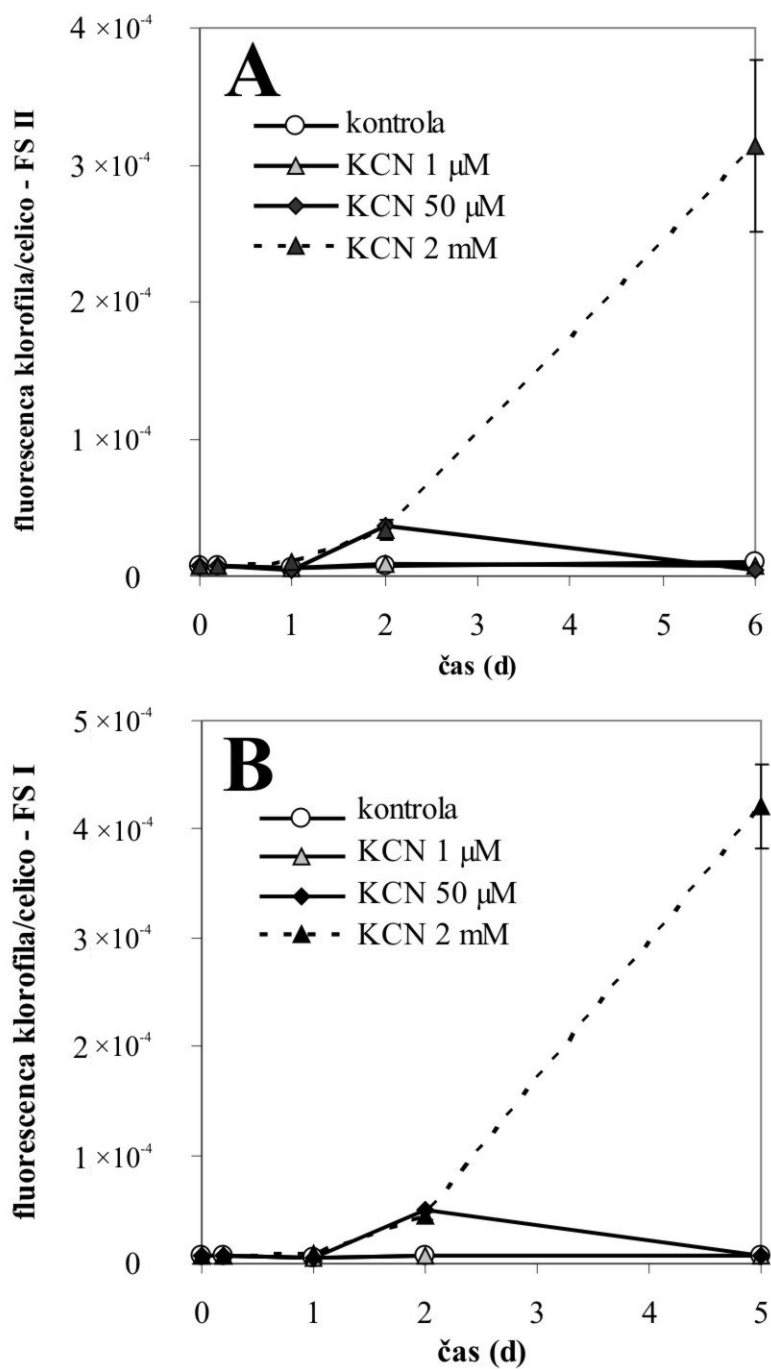
Zakasnjene vplive v časovnem obdobju nekaj ur smo opazili pri obdelovanju z ultrazvokom:  $F$  klorofila in fikocianinov se je v primerjavi s kontrolo povečala za 3-krat (Slika 30 in 31). Zakasnjene vplive v časovnem obdobju enega dne smo opazili pri obdelovanju pri obdelovanju s kombinacijo zamrzovanja in DCMU:  $F$  klorofila se je v primerjavi s kontrolo povečala za 2-krat,  $F$  fikocianinov pa 3-krat (Slika 42 in 43). Zakasnjene vplive v časovnem obdobju dveh dni smo opazili pri obdelovanju kultur s kombinacijo KCN in PP:  $F$  klorofila se je v primerjavi s kontrolo povečala za 5-krat,  $F$  fikocianinov pa 1,2-krat (Slika 40 in 41). Zakasnjene vplive v časovnem obdobju več kot dva dni smo opazili pri dodatku Tritona X-100 (Slika 32 in 33), DCMU, KCN (Slika 36 in 37) in bacitracina (Slika 38 in 39)



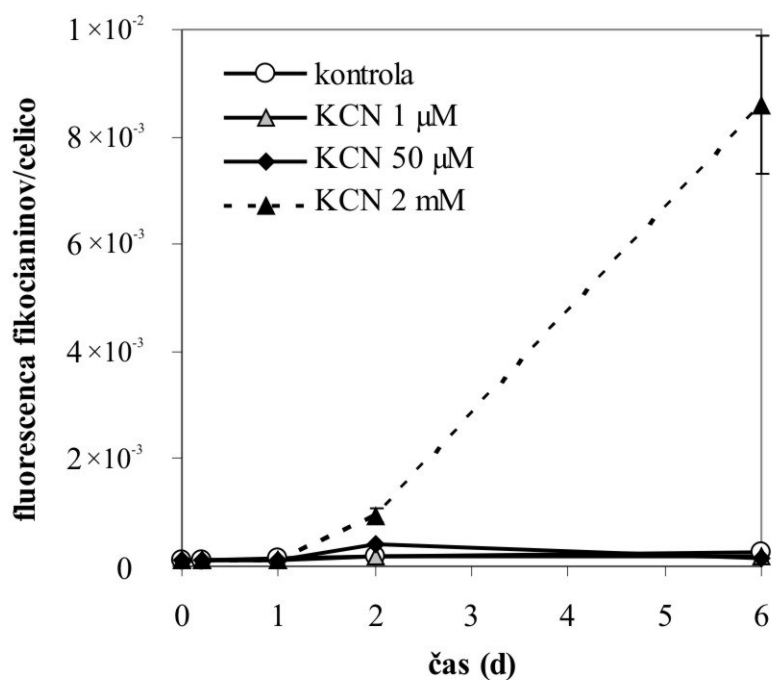
Slika 32: Vpliv Tritona X-100 na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo in kvadrati vpliv 0,01 % Tritona X-100 glede na čas.



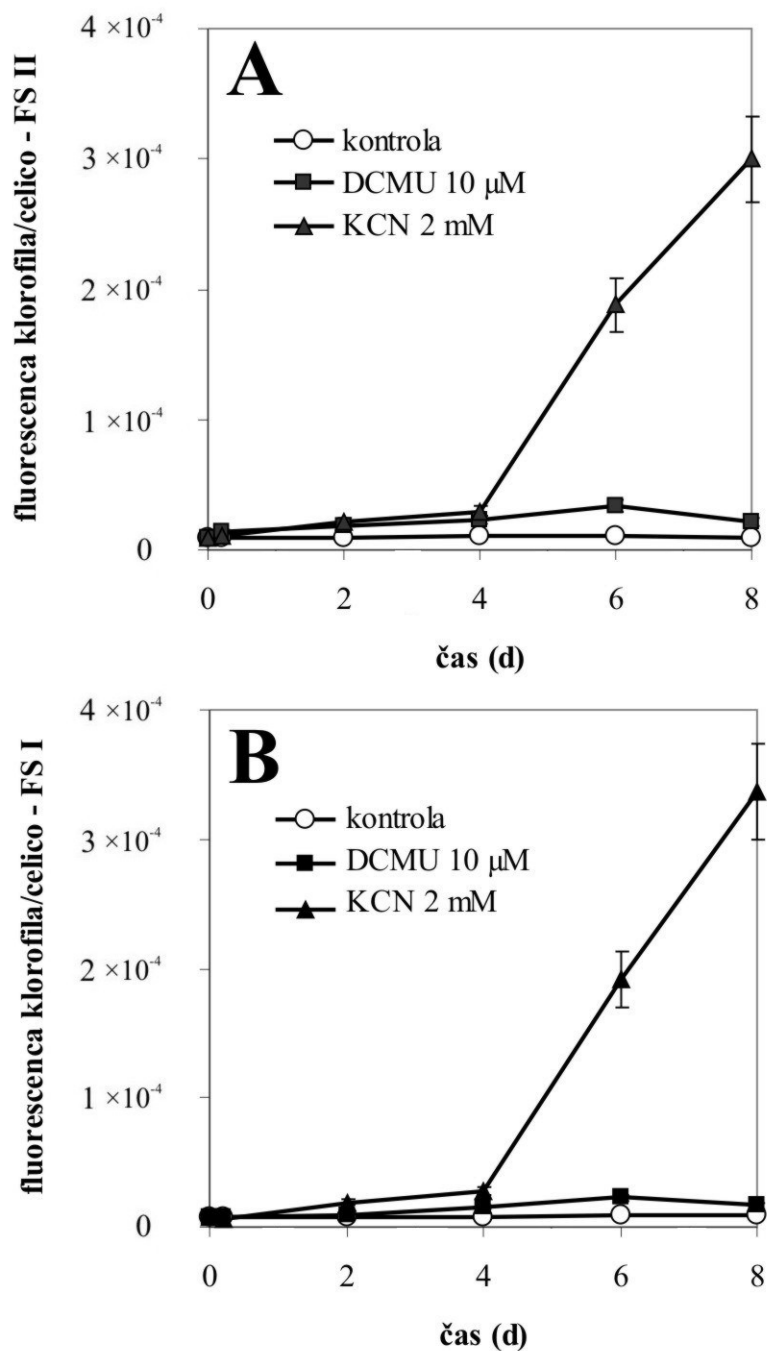
Slika 33: Vpliv Tritona X-100 na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo in kvadrati vpliv Tritona X-100 v končni koncentraciji 0,01 % glede na čas.



Slika 34: Vpliv KCN na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I seva *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, sivi trikotniki vpliv KCN v končni koncentraciji 1 µM, rombi KCN v končni koncentraciji 50 µM in črni trikotniki, povezani s prekinjeno črto, KCN v končni koncentraciji 2 mM.

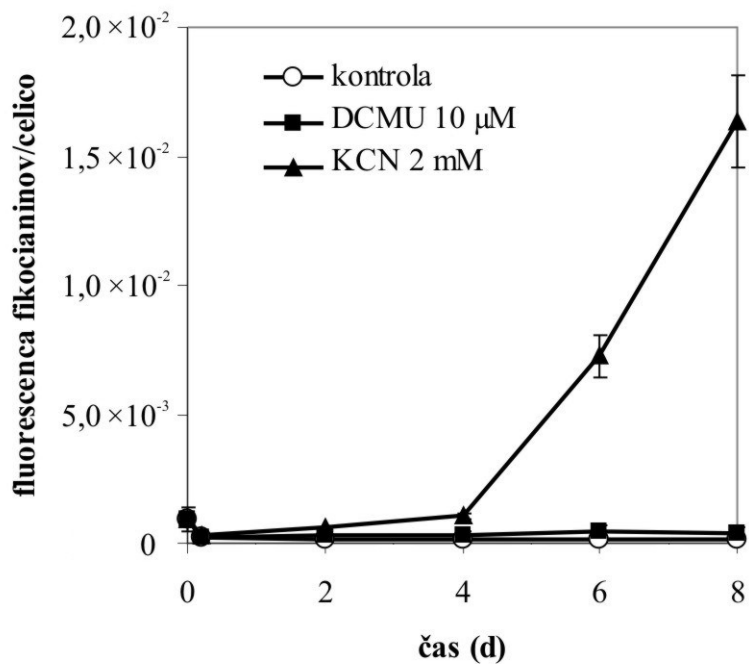


Slika 35: Vpliv KCN na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico seva *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, sivi trikotniki vpliv KCN v končni koncentraciji 1  $\mu$ M, rombi KCN v končni koncentraciji 50  $\mu$ M in črni trikotniki, povezani s prekinjeno črto, KCN v končni koncentraciji 2 mM.

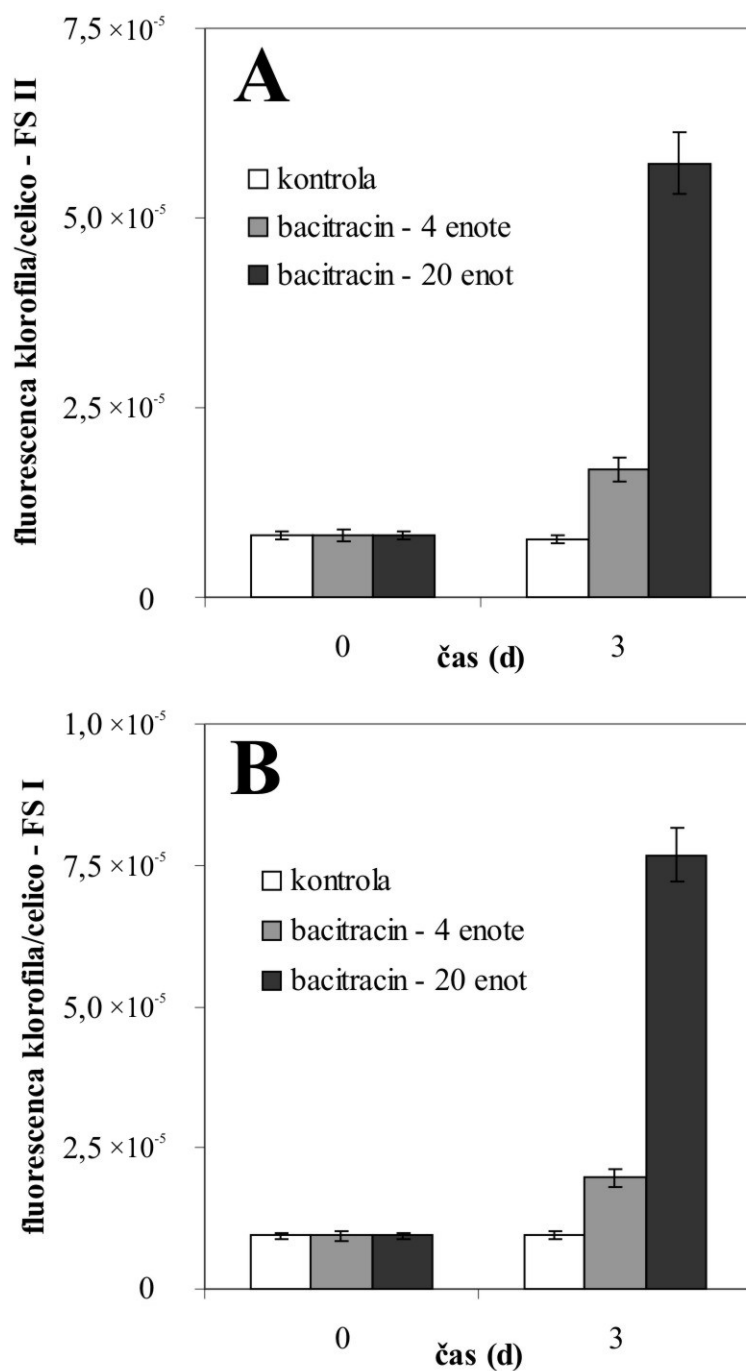


Slika 36: Vpliv DCMU in KCN na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, kvadrati vpliv DCMU v končni koncentraciji 10 µM in trikotniki vpliv KCN v končni koncentraciji 2 mM.

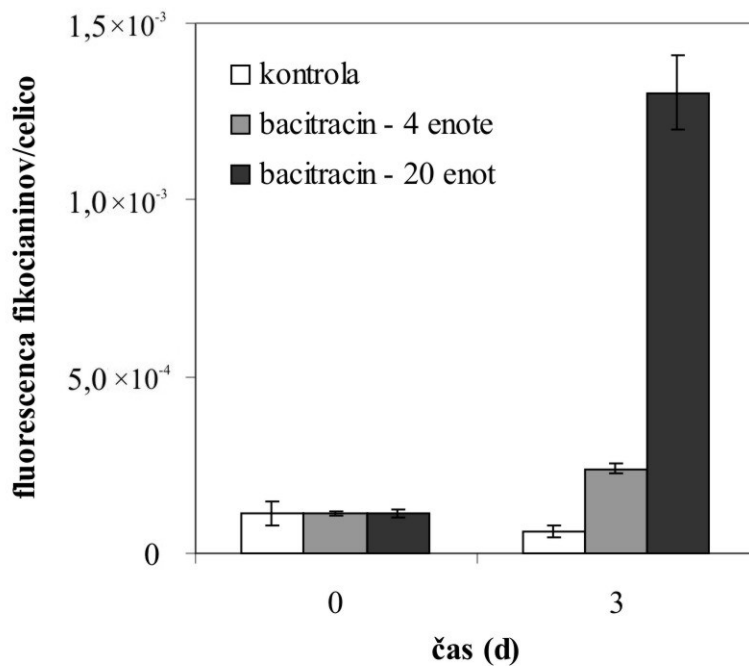




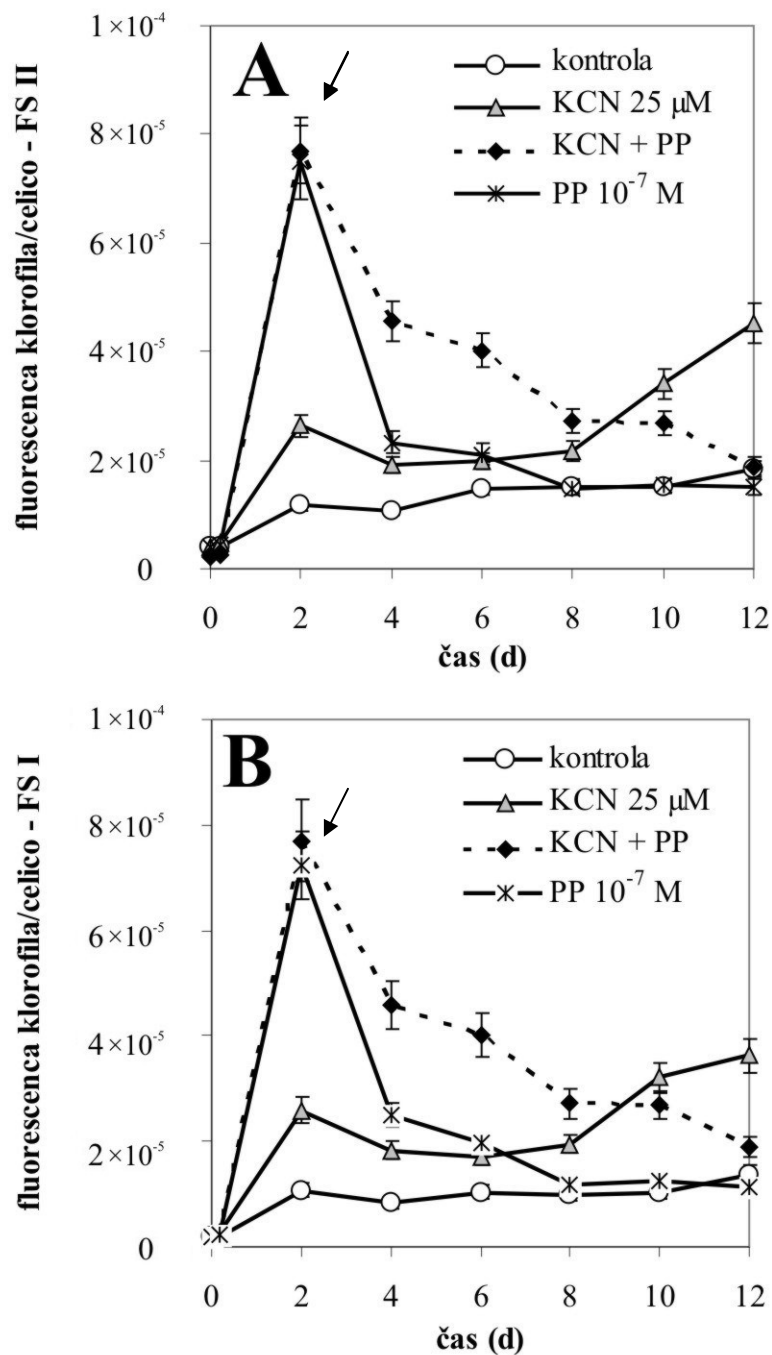
Slika 37: Vpliv DCMU in KCN na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, kvadrati vpliv DCMU v končni koncentraciji 10 µM in trikotniki vpliv KCN v končni koncentraciji 2 mM glede na čas.



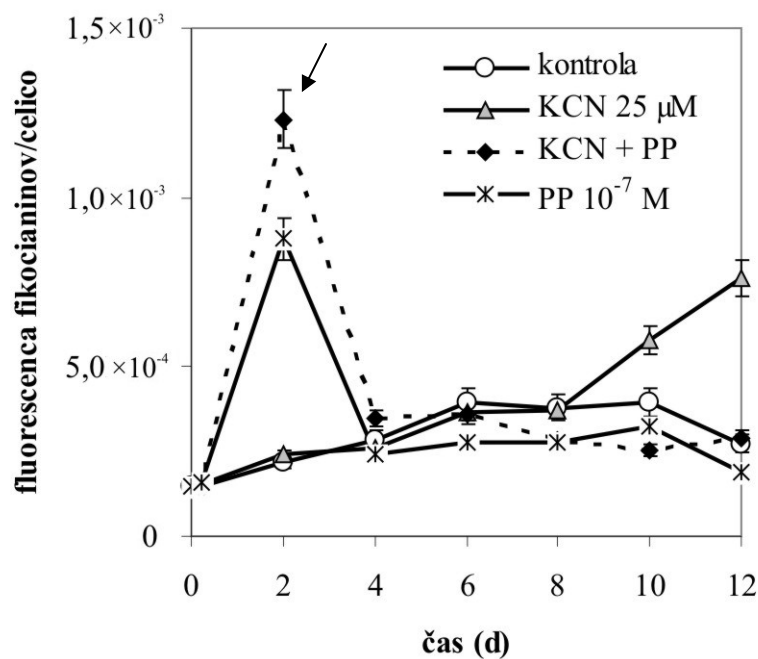
Slika 38: Vpliv bacitracina na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I seva *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Beli stolpci predstavljajo kontrolo, sivi stolpci vpliv štirih enot in črni stolpci vpliv dvajsetih enot bacitracina.



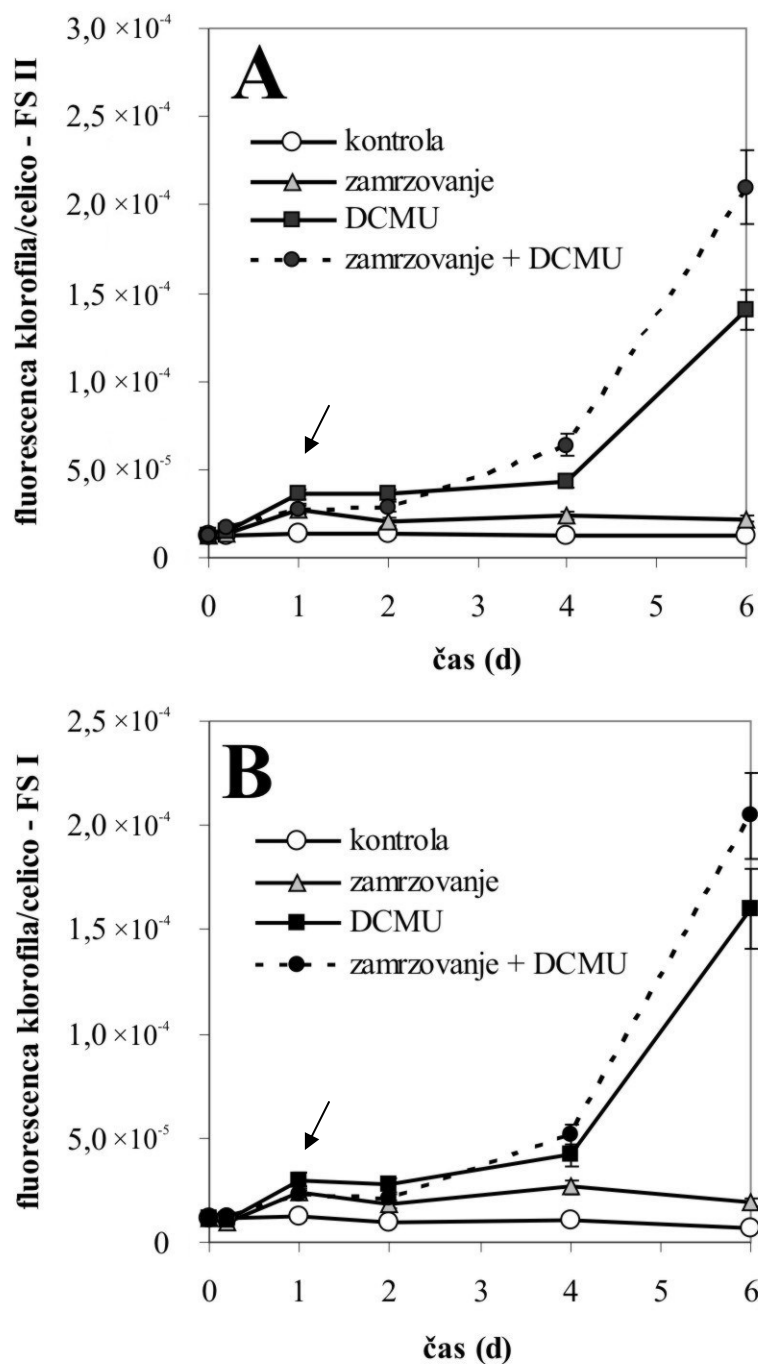
Slika 39: Vpliv bacitracina na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Beli stolpci predstavljajo kontrolo, sivi stolpci vpliv štirih enot in črni stolpci vpliv dvajsetih enot bacitracina.



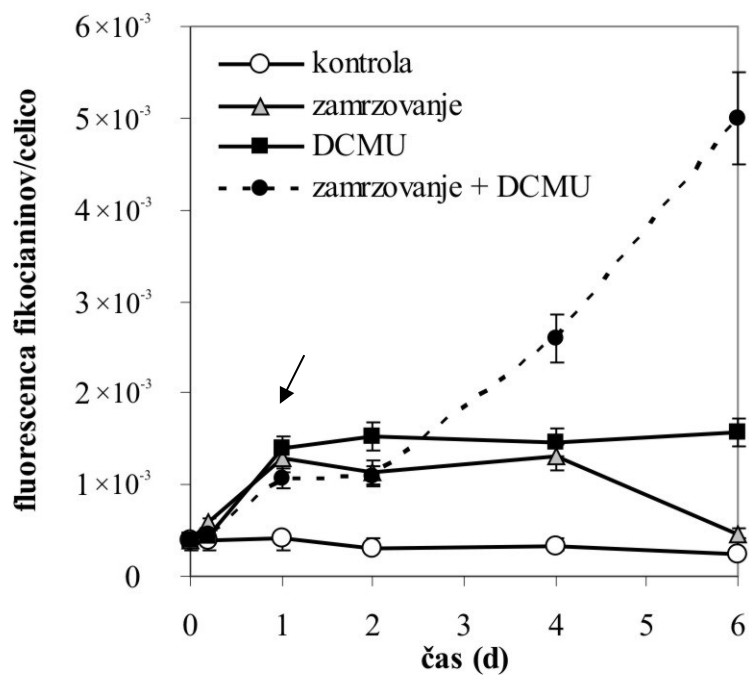
Slika 40: Vpliv KCN v končni koncentraciji 25 µM in planktopeptina BL1125 (PP) v končni koncentraciji 10<sup>-7</sup> M na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I seva *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, sivi trikotniki vpliv KCN, črni rombi, povezani s prekinjeno črto, predstavljajo kombinacijo vpliva KCN in PP in zvezdice vpliv PP. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence.



Slika 41: Vpliv KCN v končni koncentraciji 25 µM in planktopeptina BL1125 (PP) v končni koncentraciji  $10^{-7}$  M na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico pri sevu *Microcystis aeruginosa* Ma-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, sivi trikotniki vpliv KCN, črni rombi, povezani s prekinjeno črto, predstavljajo kombinacijo vpliva KCN in PP in zvezdice vpliv PP. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence.



Slika 42: Vpliv zmrzovanja in DCMU na povečanje *in vivo* fluorescence klorofila/celico v: (A) fotosistemu II in (B) fotosistemu I seva *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki vpliv zmrzovanja, kvadrati vpliv DCMU v koncentraciji 10  $\mu$ M in črni krogi, povezani s prekinjeno črto, kombinacijo zmrzovanja in DCMU. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence.



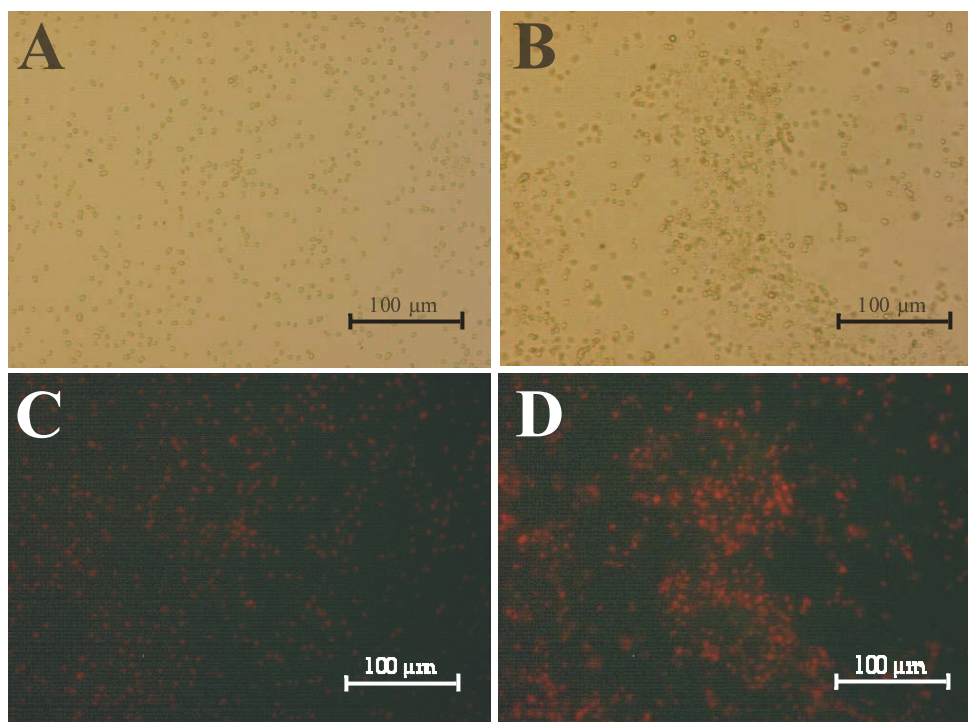
Slika 43: Vpliv zmrzovanja in DCMU na povečanje *in vivo* fluorescence fikocianinov/celico seva *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo, trikotniki vpliv zamrzovanja, kvadrati vpliv DCMU v koncentraciji  $10 \mu\text{M}$  in črni krogi, povezani s prekinjeno črto, kombinacijo zamrzovanja in DCMU. Puščica označuje začetno povečanje fluorescence.

## 4.6 VPLIV MIKROCISTINOV (MC) NA IZBRANE FITOPLANKTONSKE VRSTE

### 4.6.1 Vpliv MC na združevanje celic

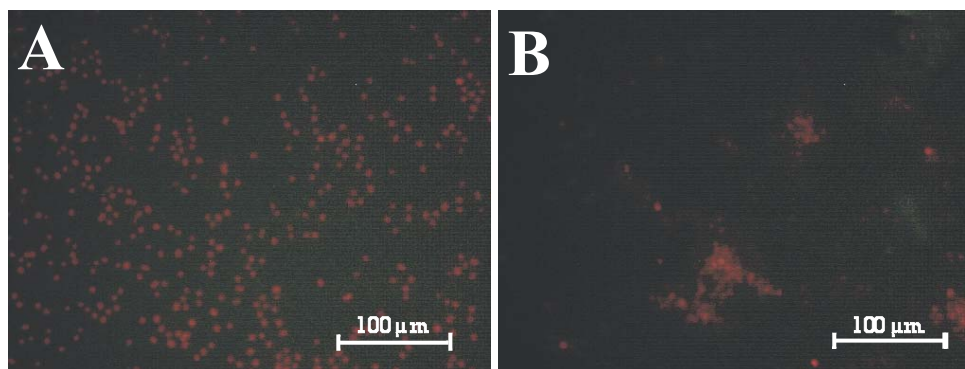
Za poskuse smo uporabili različne mikrocinovine: MC-LR, -YR, -RR in [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR. Ob dodatku MC-LR, -RR in -YR (v končni koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M) smo opazili tendenco združevanja enoceličnih kultur Ma1-NIB, Ma2-NIB in Ma4-NIB v gruče, celice tvorijo celične agregate. Celice seva Ma2-NIB so se zaradi dodatka [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M pričele združevati, kar je vidno s svetlobno mikroskopijo (Slika 44 A in B), še bolj pa z epifluorescentno mikroskopijo (Slika 45 C in D). Prav tako so se celice seva Ma4-NIB zaradi dodatka [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M pričele združevati (Slika 45). Celice v kontrolni skupini so bile razpršene, medtem ko so bile celice, ki smo jim dodali MC, združene v skupke.

Podobno smo opazili tudi pri zeleni algi Sq-NIB ob dodatku MC-LR (Slika 46) in [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR (Slika 47). V kontrolni plošči so cenobiji tvorili monosloj (Slika 46 A in 47 A), medtem ko so obdelane celice združevale v nepravilne gruče (Slika 46 B in 47 B). Ta vpliv je bil viden večji del čas poskusa, vendar najbolj opazen pri višjih koncentracijah celic.

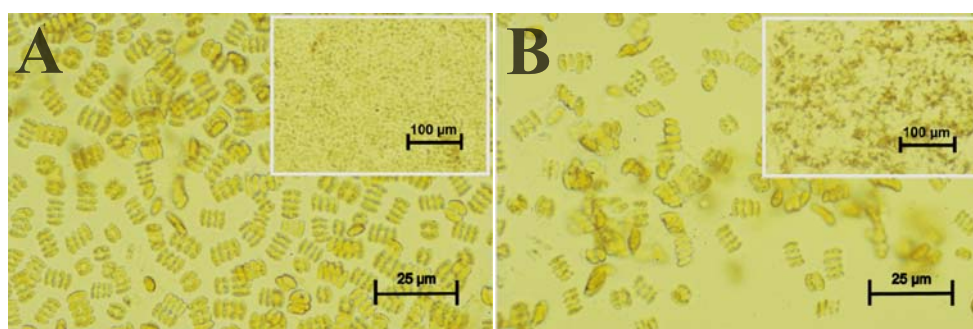


Slika 44: Vpliv mikrocinovine [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR na porazdelitev in fluorescenco celic *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB osmi dan poskusa, povečava 200 ×. A in B sta svetlobni fotografiji posneti s faznim kontrastom, C in D z epifluorescentnim mikroskopom z uporabo filtra B2A. Cianobakterije so rasle pri temperaturi 20 °C in osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Kontrolne celice so razporejene v homogeni plasti (A in C). Celice, izpostavljene  $5 \times 10^{-7}$  M [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR, niso v isti ravnini, marveč se združujejo v nepravilne gruče, ki močneje fluorescirajo (B in D).

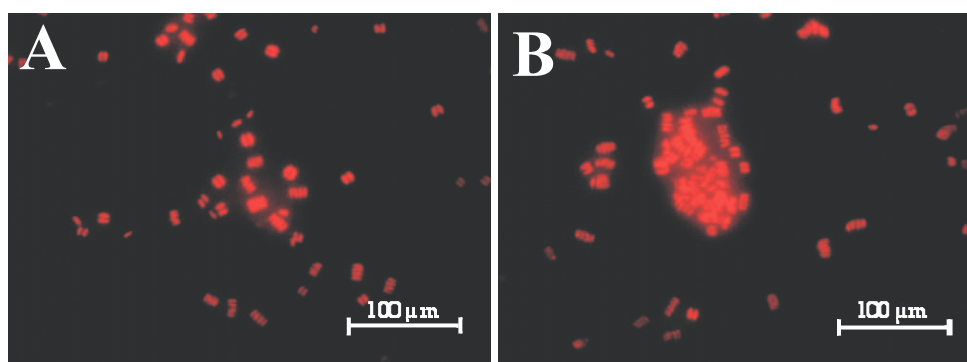




Slika 45: Vpliv mikrocistina [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR na porazdelitev in fluorescenco celic *Microcystis aeruginosa* Ma4-NIB šesti dan poskusa, povečava 200 ×, epifluorescentna mikroskopija z uporabo filtra B2A. Cianobakterije so rasle pri temperaturi 20°C in osvetlitvi 50 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. (A) Kontrolne celice so razporejene v homogeni plasti na dnu rastne kamrice. (B) Celice, izpostavljene 5×10<sup>-7</sup> M [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR, niso v isti ravnini, marveč se združujejo v nepravilne skupke, ki močneje fluorescirajo.



Slika 46: Vpliv mikrocistina MC-LR na porazdelitev cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB šesti dan poskusa, povečava 600 × in 100 × (desno zgoraj). Alge so rasle pri temperaturi 20°C in osvetlitvi 50 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. (A) Kontrolni cenobiji so razporejeni v homogeni plasti na dnu rastne kamrice. (B) Cenobiji, izpostavljeni 5×10<sup>-7</sup> M MC-LR, niso v isti ravnini, temveč se združujejo v nepravilne skupke.



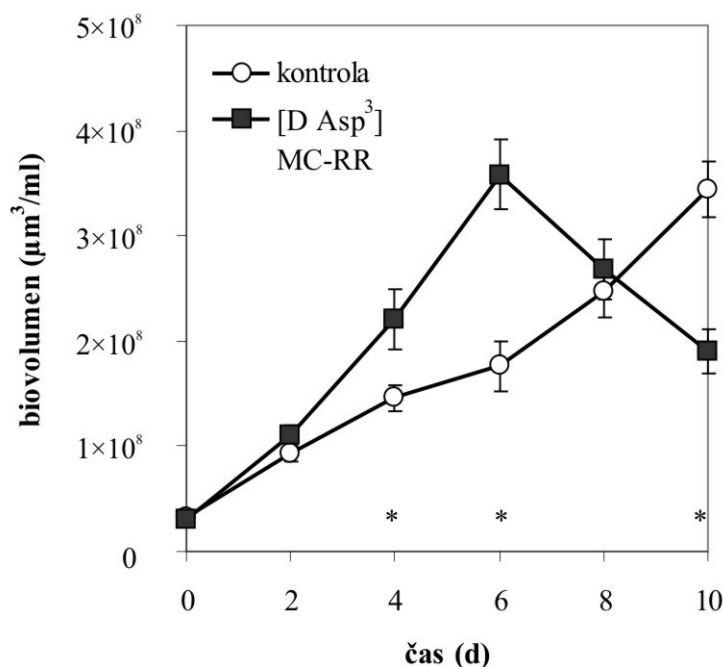
Slika 47: Vpliv mikrocistina [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji 5×10<sup>-7</sup> M na porazdelitev in fluorescenco cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB osmi dan poskusa, povečava 200 ×, epifluorescentna mikroskopija z uporabo filtra B2A. Alge so rasle pri temperaturi 20°C in osvetlitvi 50 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. (A) Kontrolni cenobiji so razporejeni dokaj enakomerno. (B) Cenobiji, izpostavljeni MC, se združujejo v nepravilne skupke, ki močneje fluorescirajo.

#### 4.6.2 Vpliv MC na volumen celic

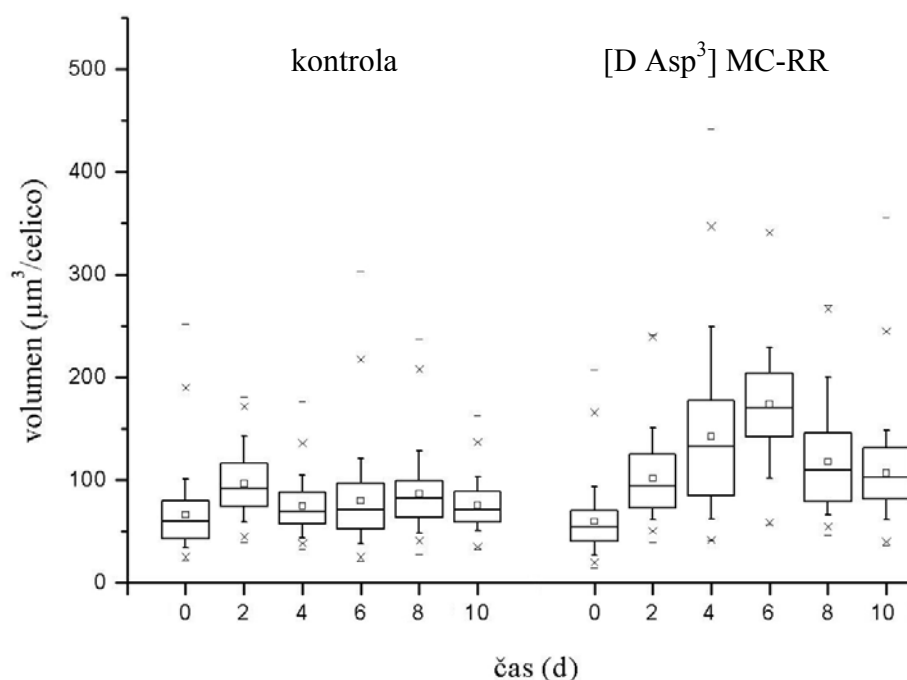
Povečanje celičnega biovolumna po dodatku MC-LR, -RR in -YR smo opazili med opazovanjem morfologije celic pod mikroskopom. Vsi trije MC so imeli podoben vpliv, z manjšimi razlikami v časovni dinamiki (Preglednica 7). [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR poveča biovolumen Sq-NIB, najbolj šesti dan poskusa (Slika 48). Vpliv [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR na povečanje volumna cenobijev je dobro viden s prikazom okvira z ročaji (Slika 49). [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR vpliva na povečanje biovolumna od drugega do osmega dne pri Sq-NIB in Ma2-NIB, ne pa pri Ma4-NIB.

Preglednica 7: Vpliv mikrocestinov MC-LR, MC-RR in MC-YR na biovolumen štirih sevov *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB, Ma2-NIB, Ma4-NIB in Ma6-NIB ter zelene alge *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB. Podatki predstavljajo aritmetično sredino biovolumnov ± SD in mediano biovolumnov. Celice so rasle pri 20 °C, osvetlitvi 20 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Končna koncentracija MC je bila 5 × 10<sup>-7</sup> M.

vrsta / sev	kontrolne celice		MC-LR		MC-RR		MC-YR	
	sred. ± SD	mediana	sred. ± SD	mediana	sred. ± SD	mediana	sred. ± SD	mediana
Ma1-NIB	59 ± 12	58	81 ± 25	69	82 ± 24	80	-	-
Ma2-NIB	47 ± 4	48	72 ± 10	63	-	-	77 ± 23	76
Ma4-NIB	61 ± 16	62	108 ± 34	91	-	-	-	-
Ma6-NIB	51 ± 6	52	77 ± 13	69	80 ± 15	70	-	-
Sq-NIB	120 ± 39	115	170 ± 55	155	198 ± 67	191	140 ± 35	135



Slika 48: Povečanje biovolumna zaradi dodatka [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji 5 × 10<sup>-7</sup> M pri vrsti *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB. Krogi predstavljajo kontrolo in kvadrati celice, ki smo jim dodali MC. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.



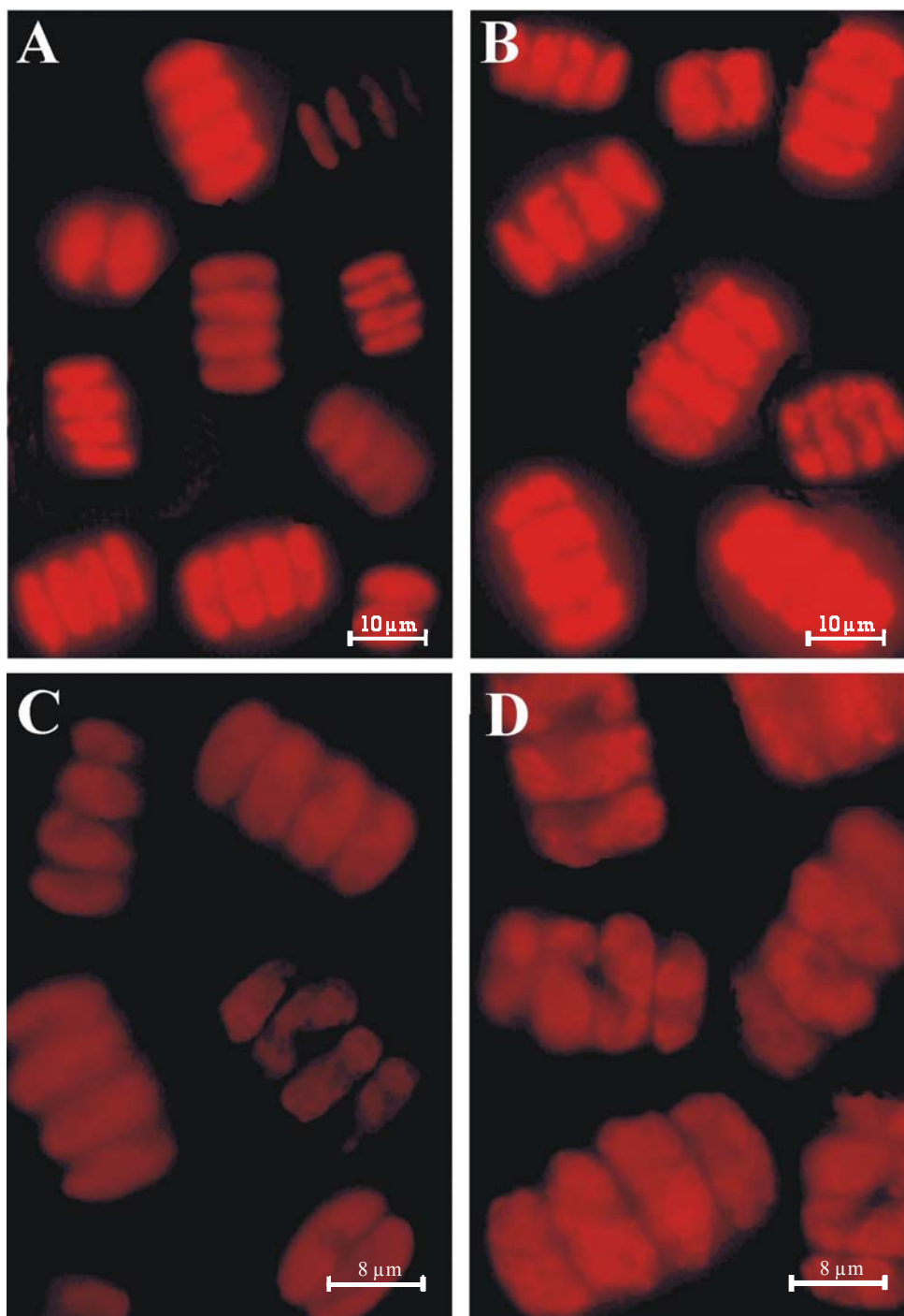
Slika 49: Spremembe biovolumna celic *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB; kontrolne celice (levo) in celice, ki smo jim dodali mikrocestin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v končni koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M (desno).

#### 4.6.3 Vpliv MC na fluorescenco in vsebnost pigmentov

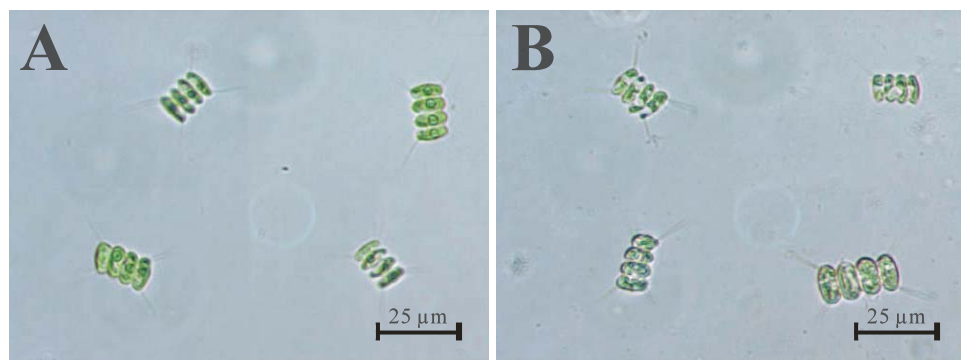
Po dodatku [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v končni koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M so imele celice fitoplanktonskih organizmov od tretjega dne dalje višjo  $F$ . To smo opazili tako pri epifluorescentnem mikroskopiranju kot pri meritvah  $F$  klorofila in fikocianinov s pomočjo fluorimetra. Cenobiji Sq-NIB, ki smo jim dodali [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR, fluorescirajo močnejše, celice so večje, nehomogeno razporejen klorofil je viden tako z epifluorescentno mikroskopijo (Slika 50) kot tudi s svetlobno mikroskopijo (Slika 51).

S fluorimetrom izmerjena  $F$  na ml obdelanih celic je bila zaradi zmanjšane hitrosti delitve celo manjša od kontrole, vendar izračuni  $F$  na celico oz.  $F$  na  $\mu\text{m}^3$  celice kažejo povečanje  $F$  obdelanih celic glede na kontrolo. Pri zeleni algi Sq-NIB je prišlo do padanja razmerja  $F$  FS II/FS I (Slika 53), saj je izrazito povečala  $F$  FS I (Slika 52). Sev Ma2-NIB ima povečano  $F$  klorofila (Slika 54) in  $F$  fikocianinov (Slika 55). Enako velja tudi za sev Ma4-NIB (Slika 56 in 58).

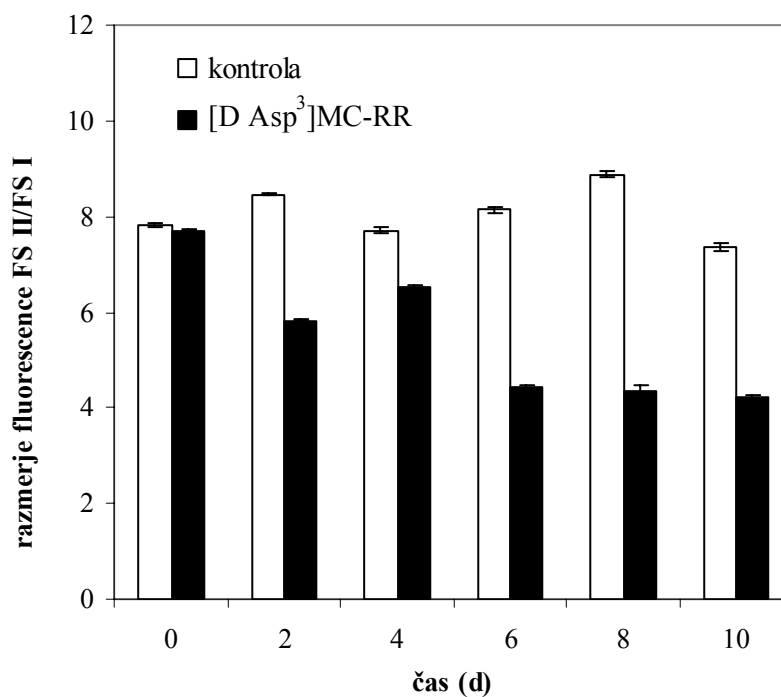
MC vplivajo tudi na vsebnost fotosinteznih pigmentov zelenih alg Sq-NIB in cianobakterij Ma1-NIB in Ma2-NIB. Po dodatku MC celice proizvajajo več fotosinteznih pigmentov. V zelenih algah je vidna povečana vsebnost klorofila  $a$  na  $\mu\text{m}^3$  celice (Slika 58 A), v cianobakterijah pa je vpliv bolj opazen pri povečani vsebnosti fikocianinov na celico (Slika 58 B). Vsebnost klorofila se pri cianobakterijah ne spreminja bistveno (podatki niso prikazani).



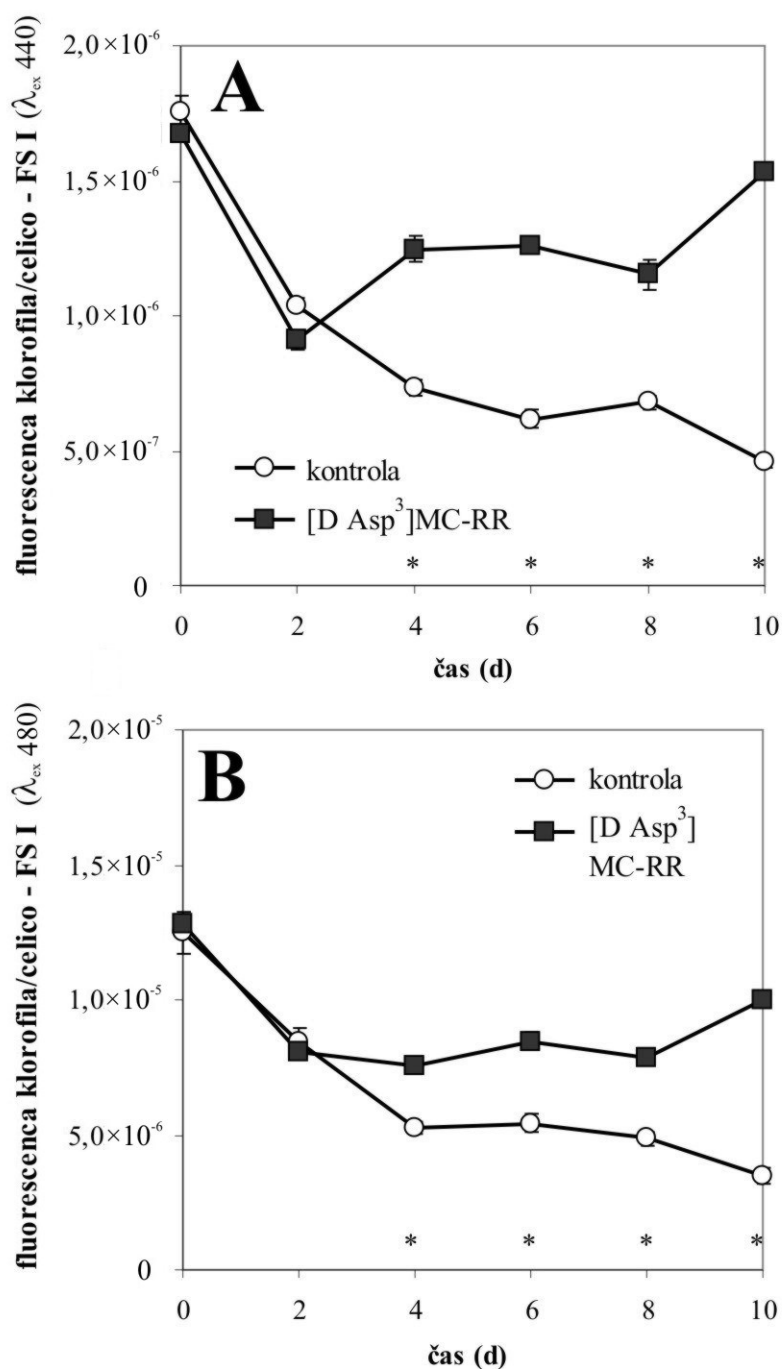
Slika 50: Avtofluorescenca cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB šesti dan po dodatku mikrocinov [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M. Epifluorescentni mikroskop z uporabo filtra B2A pri povečavi  $600 \times$  (A in B) in  $1000 \times$  (C in D). Kontrolni cenobiji (A in C), cenobiji, ki smo jih obdelali z [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR (B in D).



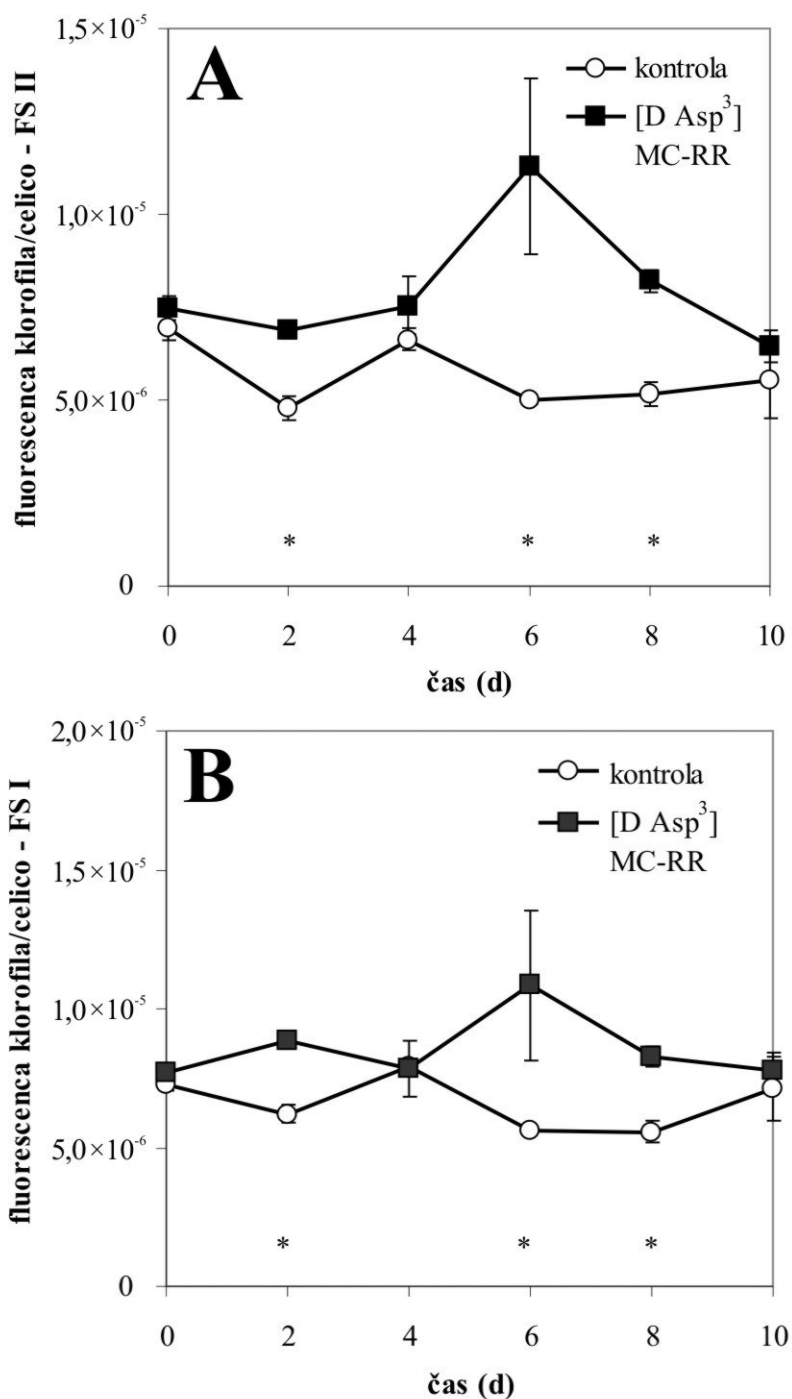
Slika 51: Vpliv mikrocestina [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR na razporeditev klorofila *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB osmi dan poskusa, povečava 600 ×, fazni kontrast. Zelene alge so rasle pri temperaturi 20°C in osvetlitvi 50 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. (A) Kontrolne celice imajo homogeno razporejen klorofil. (B) Celice, izpostavljene 5×10<sup>-7</sup> M MC-RR, imajo nepravilno razporejen klorofil, vidna so tudi področja brez klorofila.



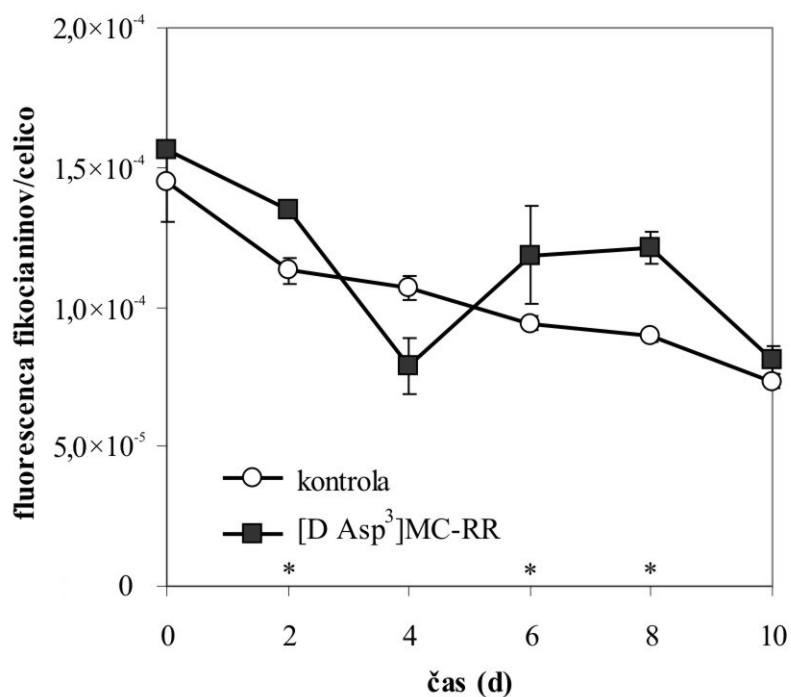
Slika 52: Razmerje *in vivo* fluorescence na mililiter kulture ( $\lambda_{\text{ex}}$  440;  $\lambda_{\text{em}}$  680/730nm - FS II/FS I) klorofila *a* zelene alge *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB glede na čas. Mikrocestin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji 5×10<sup>-7</sup> M zmanjša razmerje fluorescence od drugega dne dalje.



Slika 53: *In vivo* fluorescena klorofila *a* v relativnih enotah na celico *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB pri (A)  $\lambda_{ex}$  440 in  $\lambda_{em}$  730 nm in (B)  $\lambda_{ex}$  480 in  $\lambda_{em}$  720 nm; oboje predstavlja fluorescenco fotosistema I (FS I). Mikrocestin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenco klorofila *a*/celico od četrtega dne dalje. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.

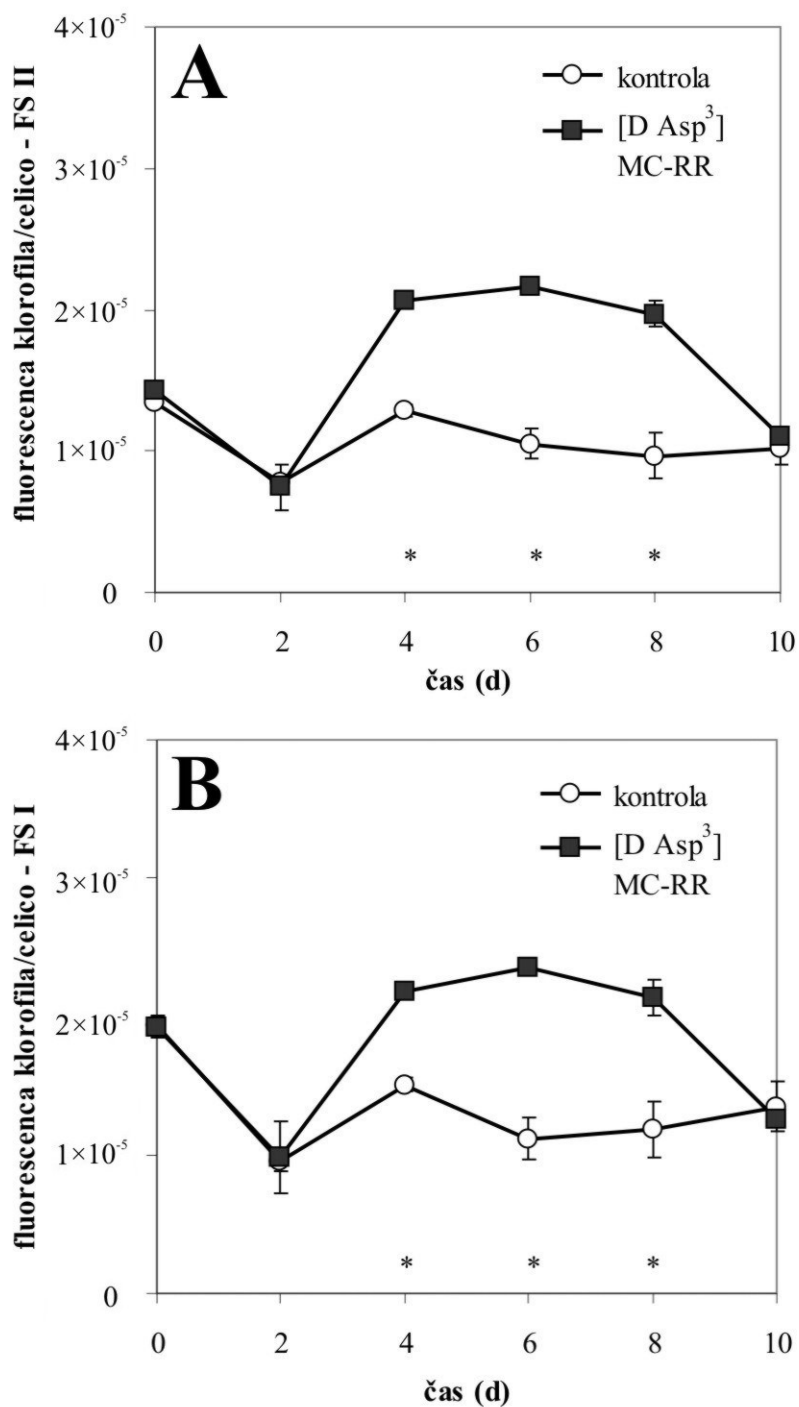


Slika 54: *In vivo* fluorescena klorofila *a* v relativnih enotah na celico *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB glede na čas pri: (A)  $\lambda_{em}$  680 nm, kar predstavlja fluorescenco fotosistema II in (B)  $\lambda_{em}$  730 nm, kar predstavlja fluorescenco fotosistema I. Mikrocistin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenco klorofila *a*/celico šesti in osmi dan poskusa v obeh fotosistemih. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.

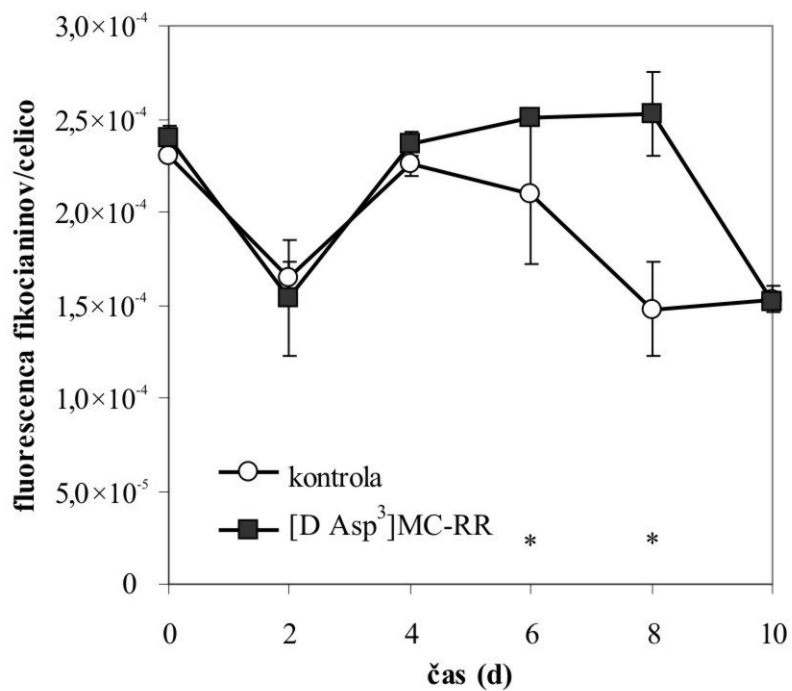


Slika 55: *In vivo* fluorescena fikocianinov v relativnih enotah na celico *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB glede na čas pri  $\lambda_{\text{ex}}$  620 in  $\lambda_{\text{em}}$  645 nm. Mikrocistin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenco fikocianinov/celico šesti in osmi dan poskusa. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.

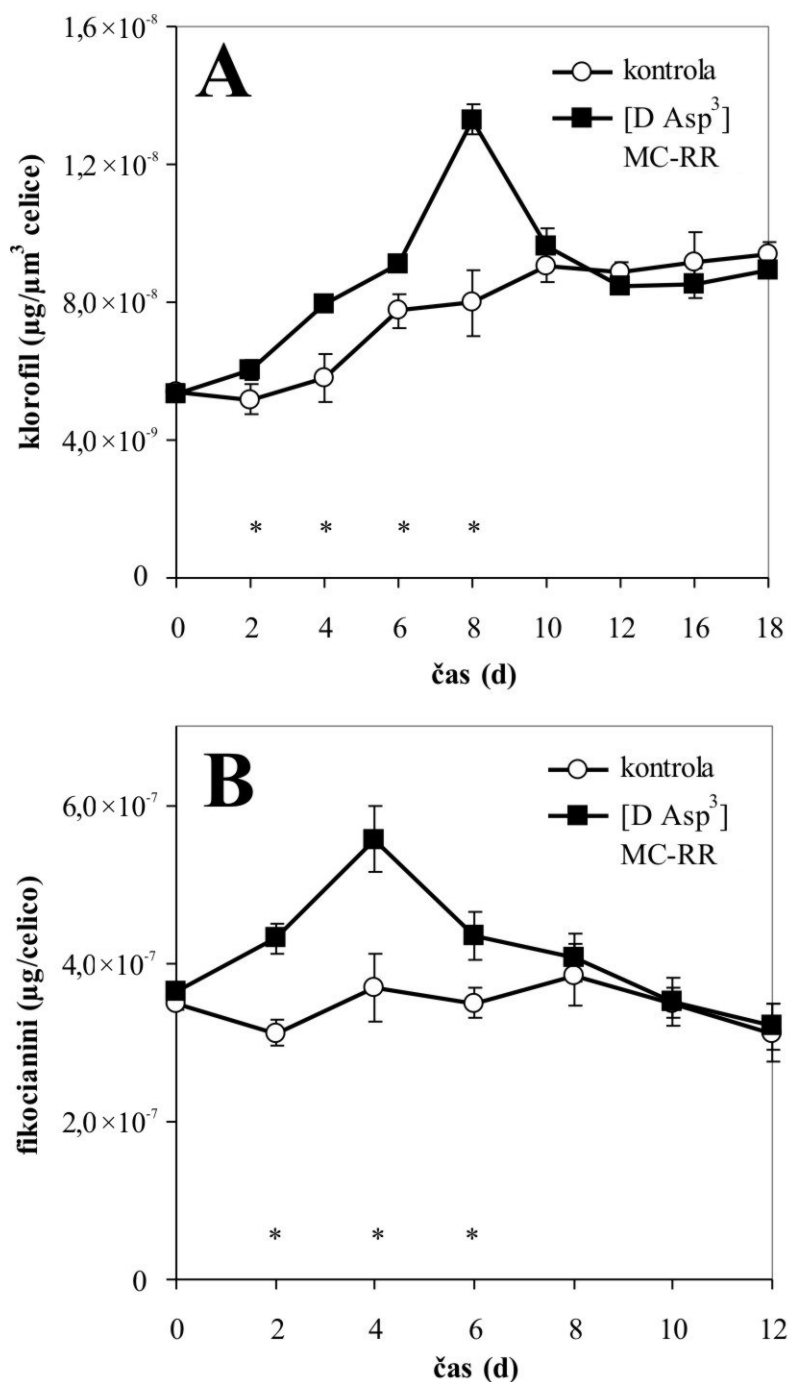




Slika 56: *In vivo* fluorescenca klorofila *a* v relativnih enotah na celico *Microcystis aeruginosa* Ma4-NIB glede na čas: (A) fotosistem II in (B) fotosistem I. Mikrocestin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenca klorofila *a*/celico šteti in osmi dan poskusa v obeh fotosistemih. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.



Slika 57: *In vivo* fluorescena fikocianinov v relativnih enotah na celico *Microcystis aeruginosa* Ma4-NIB glede na čas. Mikrocestin [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M poveča fluorescenco fikocianinov/celico šesti in osmi dan poskusa. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.

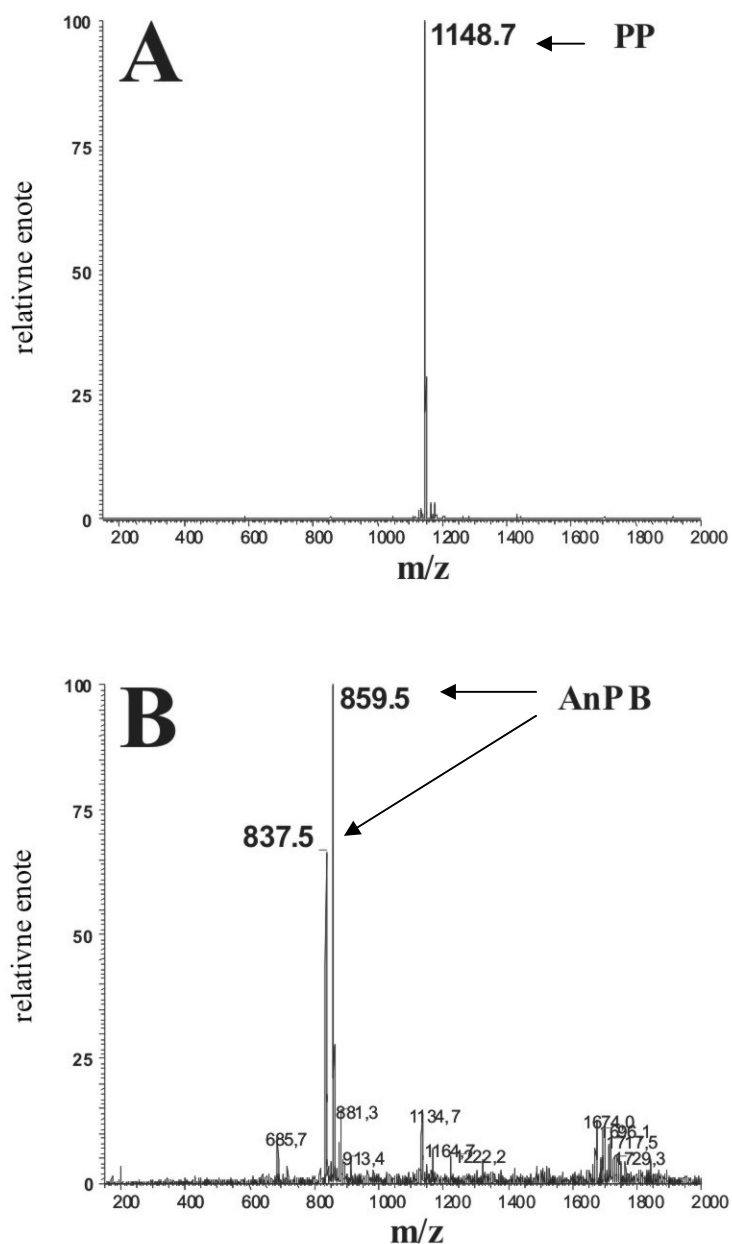


Slika 58: Vpliv mikrocestina MC-LR v koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M na povišanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov, določenih z ekstrakcijo: (A) klorofil *a* v celicah *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB in (B) fikocianini v celicah *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Fitoplanktonske kulture so rasle pri temperaturi  $20^\circ\text{C}$  in osvetlitvi  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.

## 4.7 VPLIV PLANKTOPEPTINA BL1125 (PP) IN ANABAENOPEPTINA B (AnP B) NA IZBRANE FITOPLANKTONSKE VRSTE

### 4.7.1 Masni spektri PP in AnP B

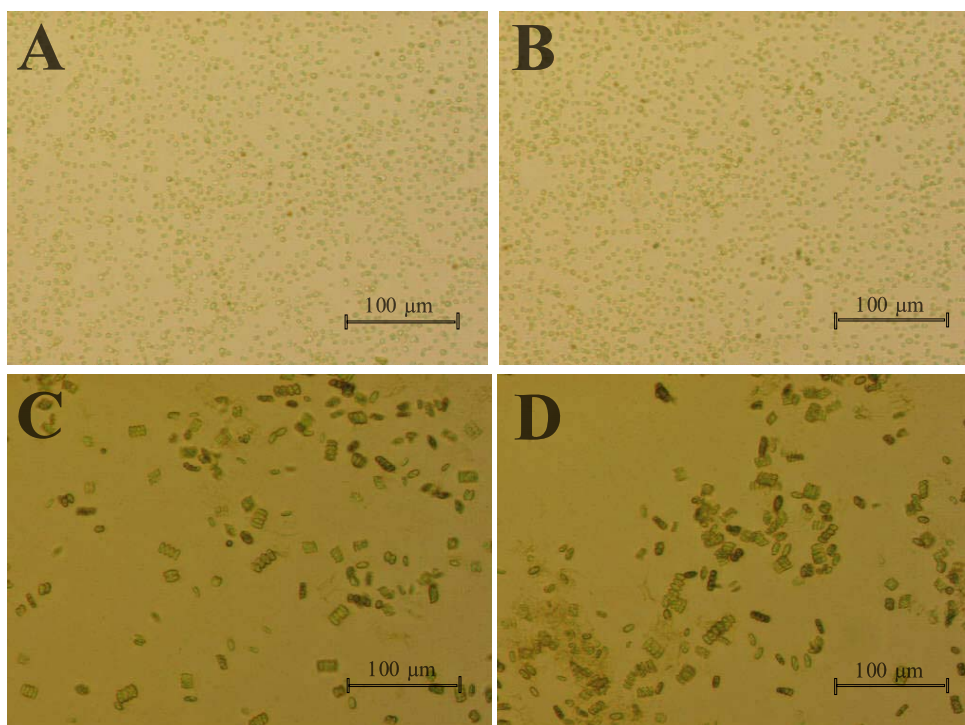
Z masno spektroskopijo smo potrdili, da so izolirane snovi res PP in AnP B. Ugotovili smo tudi, da so izolirane snovi zelo čiste. Na masnem kromatogramu PP (Slika 59 A) in AnP B (Slika 59 B), vrednosti 1148,7 in 859,5 predstavljata molsko maso molekule, na katero se je med ionizacijo vezal natrij  $[M+Na]^+$ . Molekula je pozitivno nabita, vendar ne zaradi natrija, naboj ima drugje.



Slika 59: Masni spekter: (A) planktopeptin BL1125 (PP) in (B) anabaenopeptin B (AnP B).

#### 4.7.2 Vpliv PP in AnP B na združevanje celic

PP in AnP B v končni koncentraciji  $10^{-6}$  M nista povzročila združevanja cianobakterijskih kultur *Microcystis* spp. (Slika 61 A in B). AnP B ni povzročil vidnih sprememb v združevanju cenobijev Sq-NIB, medtem ko je PP vplival na združevanje cenobijev Sq-NIB. Cenobiji v kontrolni skupini so bili bolj homogeno razporejeni (Slika 61 C), medtem ko so bili cenobiji, ki smo jim dodali PP, v končni koncentraciji  $10^{-7}$  M, združeni v skupke (Slika 61 D). Ta vpliv je bil najboljše viden četrty do osmi dan poskusa.



Slika 60: Vpliv planktopeptina BL1125 (PP) na porazdelitev (A in B) celic *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB šesti dan poskusa in (C in D) cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB osmi dan poskusa, povečava  $200\times$ , fazni kontrast. Fitoplanktonski organizmi so rasli pri temperaturi  $20^{\circ}\text{C}$  in osvetlitvi  $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

(A) Kontrolne celice so razporejene enakomerno. (B) Ni vpliva na združevanje pri dodatku  $10^{-7}$  M PP.

(C) Kontrolni cenobiji so razporejeni dokaj enakomerno. (D) Cenobiji, obdelani z  $10^{-7}$  M PP, niso v isti ravnini, marveč se združujejo v nepravilne gruče. Odstotek poškodovanih cenobijev se med kontrolnimi in obdelanimi celicami ne razlikuje statistično značilno.

#### 4.7.3 Vpliv PP in AnP B na hitrost delitve

PP kaže selektiven učinek na hitrost delitve izbranih fitoplanktonskih vrst (Preglednica 8). Vpliv ni povezan s tvorbo MC. Tretji dan po dodatku PP pri treh različnih koncentracijah ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M) smo opazili zmanjšanje gostote celic v najbolj občutljivem sevu Ma2-NIB (Slika 61 A), kjer je prišlo tudi do citolitičnih vplivov. V primerjavi z občutljivim sevom cianobakterij Ma2-NIB, je za zaviranje proliferacije zelene alge Sq-NIB potrebna 10-krat večja koncentracija ( $10^{-7}$  M) PP (Slika 61 C), medtem ko je proliferacija seva Ma1-NIB tudi pri najvišji koncentraciji ( $10^{-6}$  M) PP le malo upočasnjena.

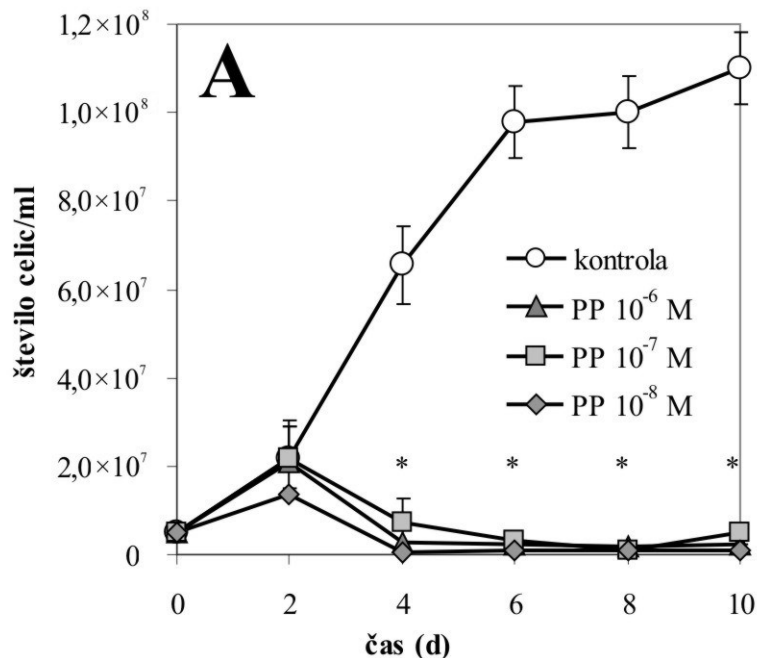
Ciklični peptid AnP B je bil citolitičen za sev Ma4-NIB (Slika 62 A) in za zeleno algo Sq-NIB (Slika 62 B). Inhibitorni učinek smo opazili pri koncentraciji  $10^{-7}$  M AnP B.

Preglednica 8: Inhibicija delitve različnih cianobakterijskih sevov, ki proizvajajo mikrocestine in sevov, ki jih ne, inducirane s planktopeptinom BL1125 (PP). Hitrost celične delitve smo določili v eksponentni fazi rasti (šesti dan). Odstotek inhibicije smo izračunali po spodnji formuli:

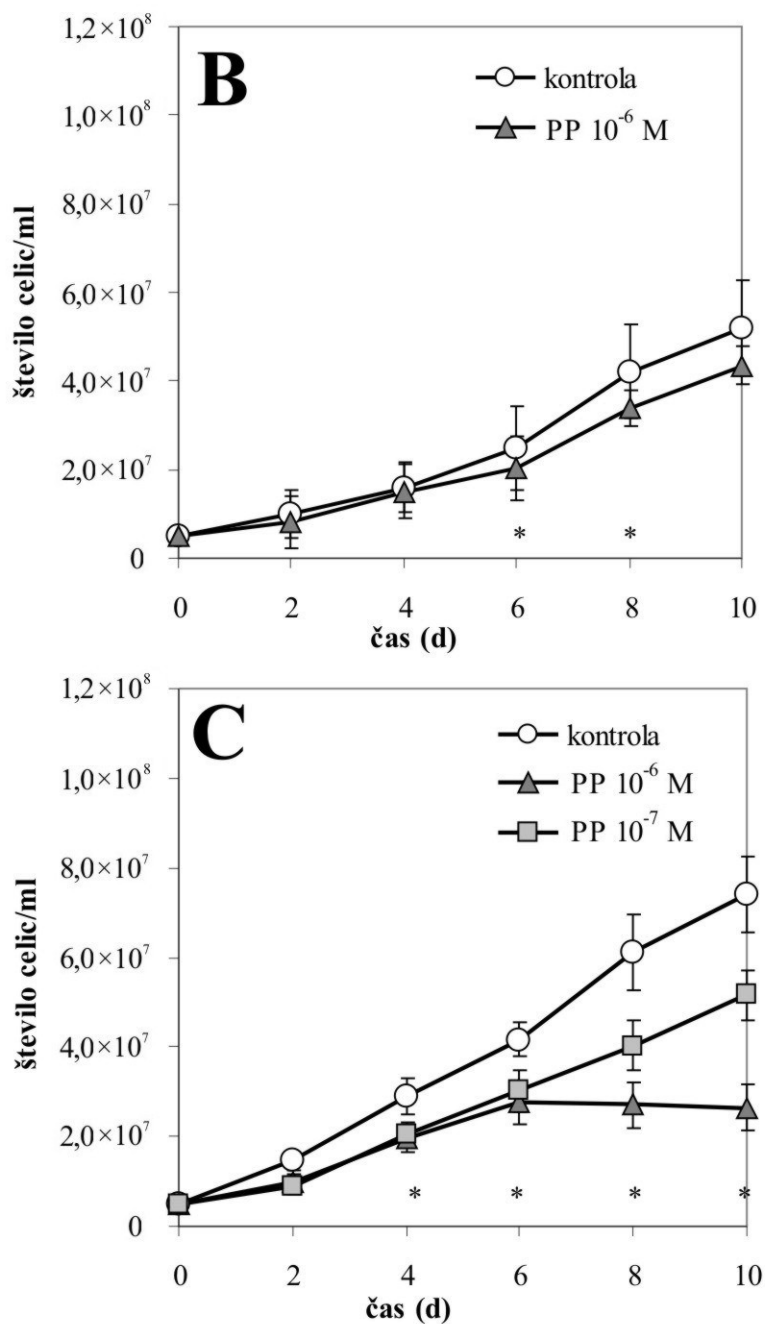
$$I[\%] = 100 - \frac{\text{število tretiranih celic/ml}}{\text{število kontrolnih celic/ml}} \times 100$$

vrsta/sev *	tvorba mikrocestinov	inhibicija delitve (I)	
		I [%] PP 10 <sup>-7</sup> M	I [%] PP 10 <sup>-8</sup> M
Ma-NIB	-	22	3
Ma2-NIB	-	89	24
Ma4-NIB	+	62	n.d.
Ma6-NIB	-	82	79
Ma15-NIB	-	50	1
Msp-NIB	+	84	n.d.
Msp2-NIB	+	48	68

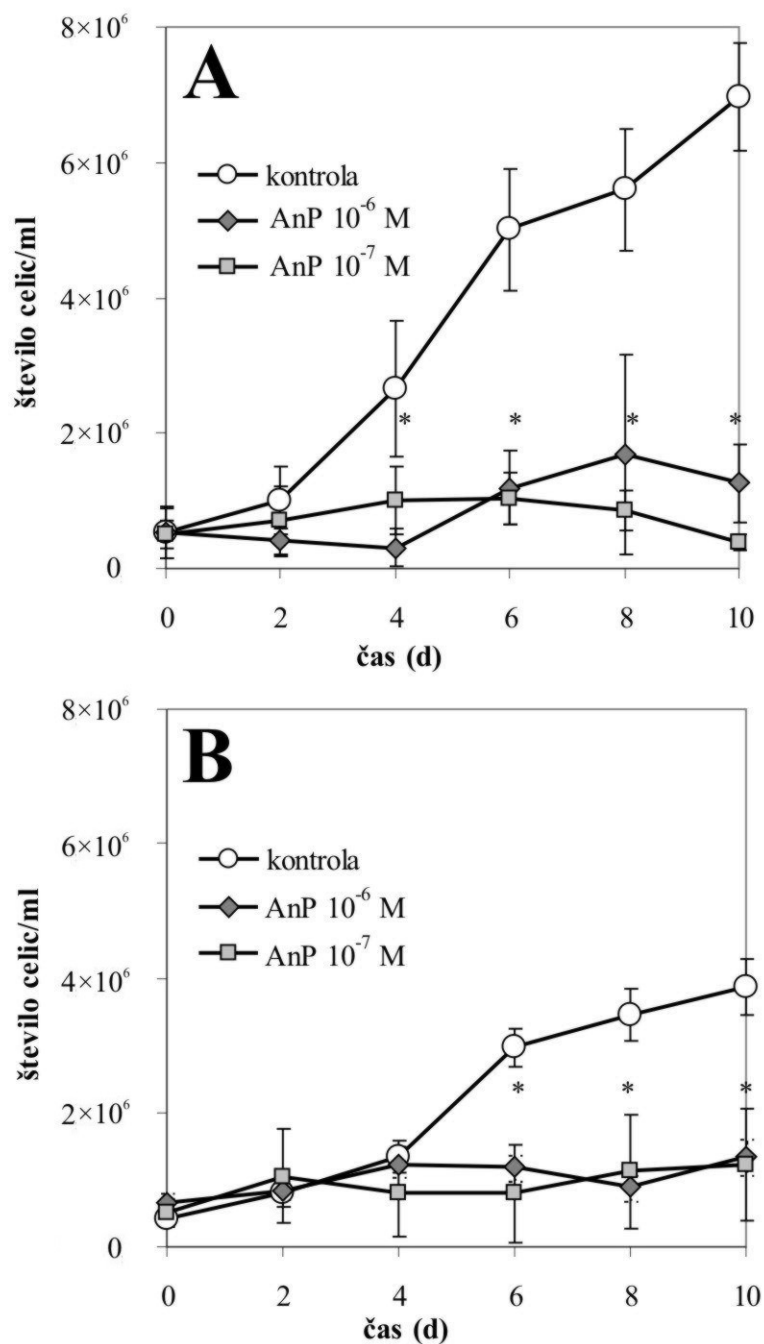
\* Ma = *Microcystis aeruginosa*, Msp = *Microcystis* sp.  
 n.d. = ni določeno



Slika 61: Rastne krivulje (aritmetična sredina ± SD): (A) sev *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB. Kontrole (krogi) in celice, obdelane s planktopeptinom BL1125 (PP) pri koncentracijah 10<sup>-6</sup> M (trikotniki), 10<sup>-7</sup> M (kvadrati) in 10<sup>-8</sup> M (rombi). Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.



Slika 61: Rastne krivulje (aritmetična sredina  $\pm$  SD): (B) sev *Microcystis aeruginosa* Ma1-NIB in (C) alga *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB. Kontrole (krogi) in celice, obdelane s planktopeptinom BL1125 (PP) pri koncentracijah  $10^{-6}$  M (trikotniki),  $10^{-7}$  M (kvadrati) in  $10^{-8}$  M (rombi). Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.



Slika 62: Rastne krivulje (aritmetična sredina  $\pm$  SD): (A) sev *Microcystis aeruginosa* Ma4-NIB in (B) alga *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB. Kontrole (krogi) in celice, obdelane s anabaenopeptinom B (AnP B) pri koncentracijah  $10^{-6}$  M (rombi) in  $10^{-7}$  M (kvadrati). Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.

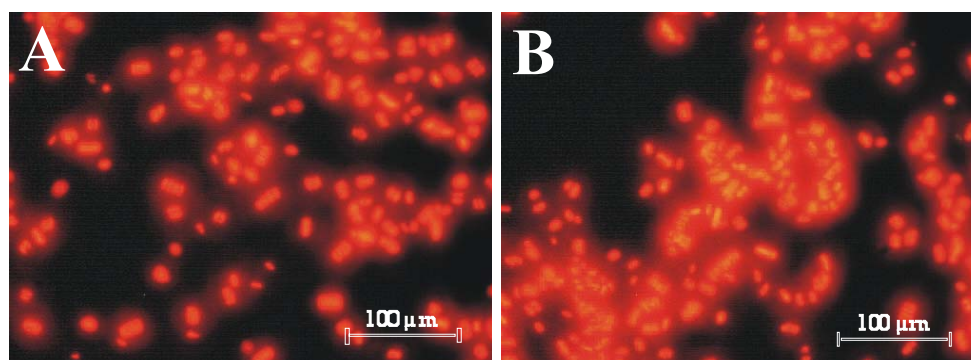


#### 4.7.4 Vpliv PP in AnP B na fluorescenco in vsebnost fotosinteznih pigmentov

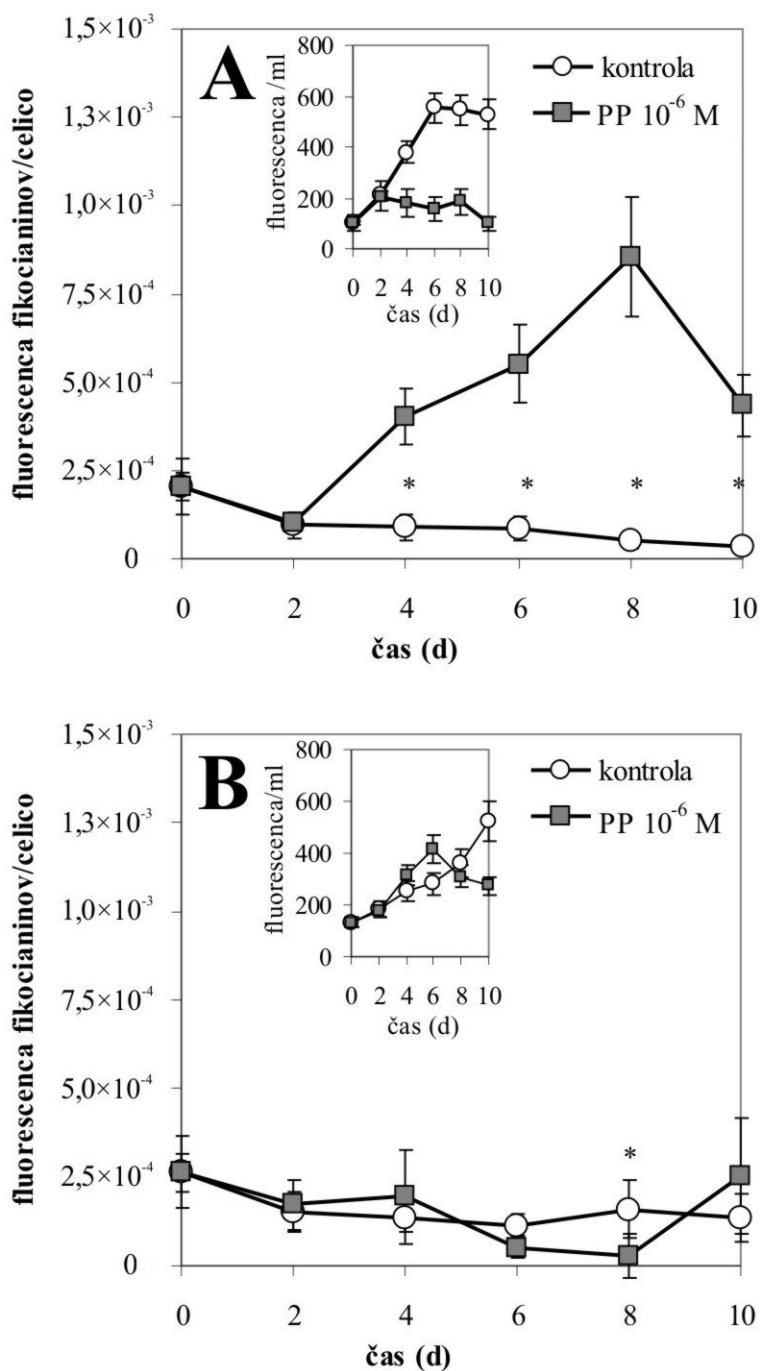
Četrty dan po dodatku PP pri sevu Ma2-NIB zasledimo povečanje *F* fikocianinov na celico (Slika 64 A), čeprav celotna *F* fikocianinov zaradi zmanjšane števila celic v kulturi (Slika 61 A) ostaja stalna ali se celo rahlo zmanjšuje (insert na Sliki 64 A). V nasprotju s tem PP kaže le majhen učinek na *F* fikocianinov manj občutljivega seva Ma1-NIB (Slika 64 B), kot bi lahko pričakovali iz rezultatov rasti krivulj (Slika 61 B). Kulture pri katerih smo zasledili značilno povečanje *F* na celico, smo centrifugirali in supernatantom ponovno izmerili *F* fikocianinov. Delež *F* fikocianinov v supernatantih kultur je zanemarljiv.

Tudi *F* klorofila potrjuje selektivni vpliv PP na različne fitoplanktonske organizme. PP vpliva na FS II in FS I, odvisno od vrste fitoplanktonskega organizma. Sev Ma2-NIB, izpostavljen PP (Slika 65 A), kaže povečano *F* pri  $\lambda_{em}$  680 nm (FS II) glede na čas, medtem ko sev Ma1-NIB ne kaže nobenih velikih sprememb zaradi dodatka PP, tudi pri 10-krat višji koncentraciji PP (Slika 65 B). Predstavnik zelenih alg, Sq-NIB, kaže drug tip odgovora na prisotnost PP, in sicer s povečanjem *F* FS I (Slika 65 C). Kulture, pri katerih smo zasledili značilno povečanje *F* na celico, smo centrifugirali in supernatantom ponovno izmerili *F*. Delež *F* klorofila v supernatantih kultur je zanemarljiv. Slika 66 kaže povečano vsebnost klorofila na celico Ma2-NIB. Slika 63 kaže povečano *F* klorofila in nepravilno združevanje cenobijev Sq-NIB, posneto z epifluorescentnim mikroskopom.

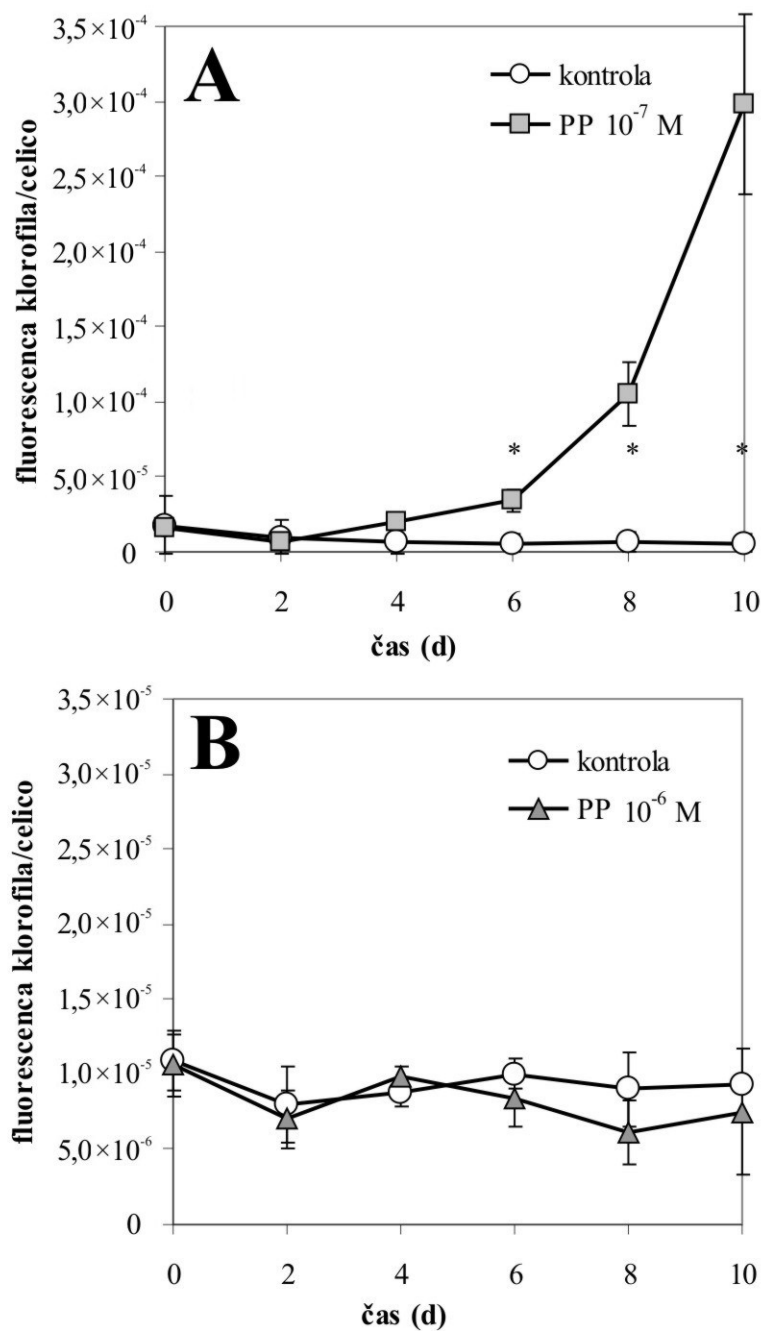
Vplivi PP so povezni tudi s svetlobo, saj v odsotnosti svetlobe nismo opazili nobenih vplivov na *F*. Fotosintezni pigmenti Sq-NIB zaradi dodatka PP v koncentraciji  $10^{-7}$  M niso v večji meri podvrženi poškodbam, do katerih pride zaradi gojenja v temi (Slika 67).



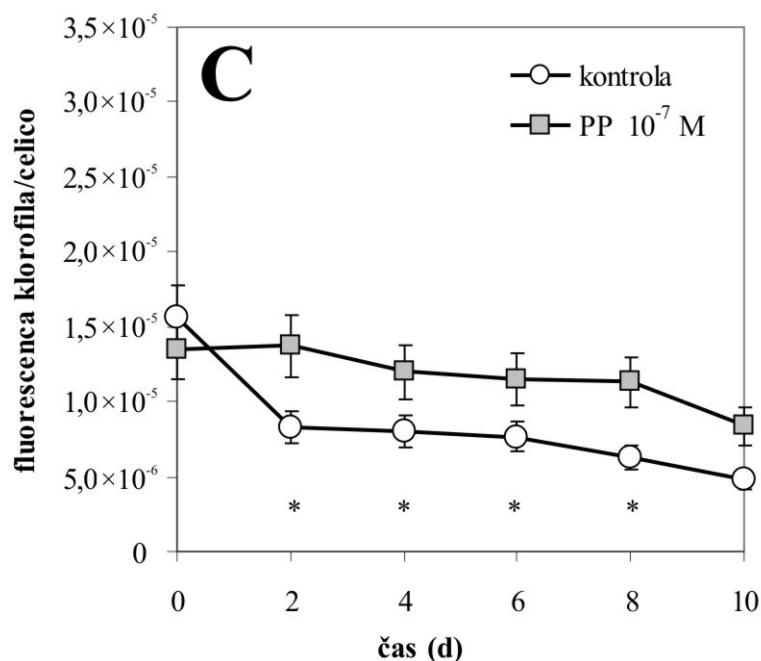
Slika 63: Vpliv planktopeptina BL1125 (PP) v koncentraciji  $10^{-7}$  M na avtofluorescenco in združevanje cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB pri povečavi 200x: (A) kontrolni cenobiji, (B) cenobiji, obdelani s PP, osmi dan poskusa.



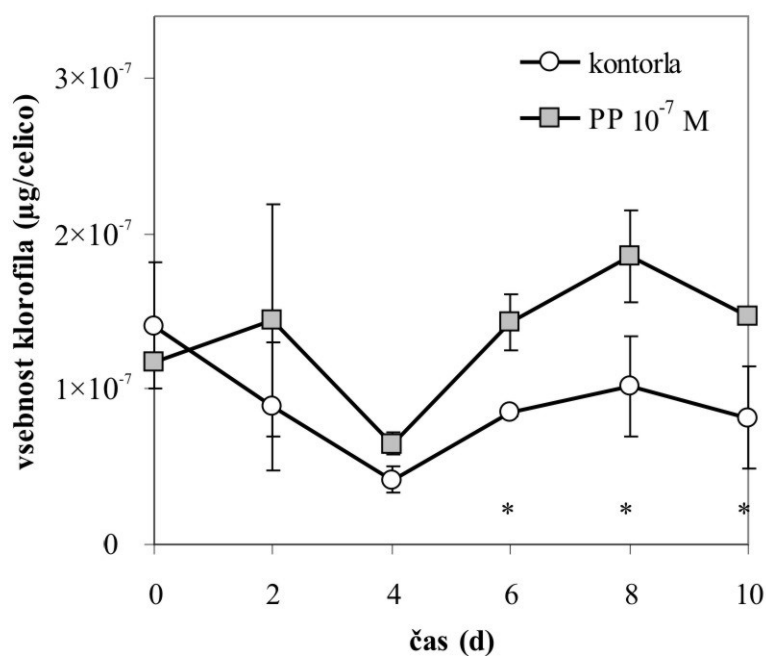
Slika 64: *In vivo* fluorescena fikocianinov ( $\lambda_{ex}$  620,  $\lambda_{em}$  645 nm) v relativnih enotah na celico (aritmetična sredina  $\pm$  SD): (A) sev *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB in (B) Ma1-NIB. Prikazana je fluorescena preračunana na celico in fluorescena na ml (insert v zgornjem delu vsake slike). Kontrolne celice (krogi) in celice, obdelane z 10<sup>-6</sup> M planktopeptinom BL1125 (PP) (kvadrati). Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.



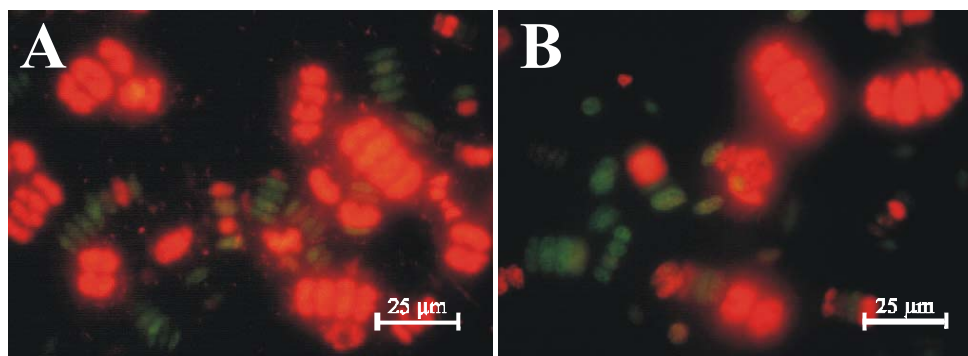
Slika 65: *In vivo* fluorescenca klorofila v relativnih enotah na celico (aritmetična sredina  $\pm$  SD):  
(A) sev *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB ( $\lambda_{\text{ex}}$  440,  $\lambda_{\text{em}}$  680 nm – FS II), (B) sev Ma1-NIB  
( $\lambda_{\text{ex}}$  440,  $\lambda_{\text{em}}$  680 nm –FS II). Kontrolne celice (krogi) in celice, obdelane z  $10^{-6}$  M  
(trikotniki) in  $10^{-7}$  M planktopeptinom BL1125 (PP) (kvadrati). Zvezdice predstavljajo statistično  
značilne razlike.



Slika 65: *In vivo* fluorescenca klorofila v relativnih enotah na celico (aritmetična sredina ± SD): (C) alga *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB ( $\lambda_{\text{ex}}$  440,  $\lambda_{\text{em}}$  730 nm – FS I). Kontrolne celice (krogi) in celice, obdelane z  $10^{-7}$  M planktopeptinom BL1125 (PP) (kvadrati). Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.



Slika 66: Povečanje vsebnosti klorofila *a* na celico *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB zaradi dodatka planktopeptina BL1125 (PP) v končni koncentraciji  $10^{-7}$  M. Vsebnosti smo določili z ekstrakcijo. Zvezdice predstavljajo statistično značilne razlike.



Slika 67: Avtofluorescenca cenobijev *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB, ki smo jih po dodatku planktopeptina BL1125 (PP) v koncentraciji  $10^{-7}$  M gojili tri dni v temi. Intakten klorofil fluorescira rdeče, celice, ki odmirajo, so zelene. Ni razlik v fluorescenci in razporeditvi klorofila med (A) kontrolnimi cenobiji in (B) cenobiji, ki smo jim dodali PP.

#### 4.7.5 HPLC analiza supernatantov

Supernatante kontrolnih in obdelanih kultur smo analizirali s HPLC. Površine vrhov pri dveh krajših zadrževalnih časih (2,7 in 3,1 min) in koncentracije PP pri zadrževalnem času 3,6 minut so prikazane v Preglednici 9. Koncentracija čistega PP se skozi poskus zmanjšuje, nastajajo novi vrhovi s krajšimi zadrževalnimi časi s podobnimi absorpcijskimi spektri, zato sklepamo, da gre za produkte razgradnje oz. razpada PP. V supernatantu seva Ma1-NIB, ki na PP ni bil občutljiv, ni prišlo do zmanjšanja koncentracij PP, niti do tvorbe novih produktov.

Preglednica 9: Primerjava koncentracij planktopeptina BL1125 (PP) v  $\mu\text{g/ml}$  in površine vrhov (p. vrha) biotransformacijskih produktov (BP) v supernatantih kulture *Microcystis aeruginosa* Ma2-NIB in *Scenedesmus quadricauda* Sq-NIB. Površino vrhov smo določili pri 225 nm. Zadrževalni čas BP je 2,7 in 3,1 minute. Zadrževalni čas PP je 3,6 minute.

dan	<i>Microcystis aeruginosa</i> Ma2-NIB			<i>Scenedesmus quadricauda</i> Sq-NIB		
	2,7 BP p. vrha	3,1 BP p. vrha	3,6 PP ( $\mu\text{g/ml}$ )	2,7 BP p. vrha	3,1 BP p. vrha	3,6 PP ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	4.200	6.600	0,83	1.800	4.000	0,87
3	7.200	5.100	0,42	4.600	7.000	0,84
5	9.800	4.300	0,08	4.800	4.800	0,85
7	8.500	2.000	0,02	5.000	3.700	0,85
9	17.300	1.900	0	10.500	5.100	0,71
11	n.d.	n.d.	n.d.	12.300	4.700	0,85
13	n.d.	n.d.	n.d.	14.000	3.500	0,47
kontrola	1.100-2.200	0	0	1.100-1.900	0	0

n.d. = ni določeno

#### 4.8 PREGLED VPLIVOV CIKLIČNIH PEPTIDOV

Povzetek najbolj pomembnih vplivov cikličnih peptidov cianobakterij na cianobakterije in zelene alge je prikazan v Preglednici 10.

Preglednica 10: Povzetek vplivov cikličnih peptidov cianobakterij (mikrocistin-LR, mikrocistin-YR, mikrocistin-RR, [DAsp<sup>3</sup>]mikrocistin-RR, planktopeptin BL1125 in anabaenopeptin B) na hitrost delitve, inducirano združevanje celic, povečan biovolumen, fluorescenco in vsebnost fotosinteznih pigmentov pri cianobakterijah in zelenih algah. Znak plus označuje vpliv, znak minus označuje, da do vpliva ni prišlo.

VPLIV NA	organizem	ciklični peptidi cianobakterij					
		MC-LR	MC-YR	MC-RR	[DAsp <sup>3</sup> ]MC-RR	PP	AnP B
		5×10 <sup>-7</sup> M	5×10 <sup>-7</sup> M	5×10 <sup>-7</sup> M	5×10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-6</sup> M
hitrost delitve	cianobakterije	+	+	+	+	+	+
	zelene alge	+	+	+	+	+	+
združevanje celic	cianobakterije	+	+	+	+	-	-
	zelene alge	+	+	+	+	+	-
povečan biovolumen	cianobakterije	+	+	+	+	-	-
	zelene alge	+	+	+	+	-	-
povišana fluorescenca pigmentov	cianobakterije	+	n. d.	n. d.	+	+	+
	zelene alge	+	n. d.	n. d.	+	+	+
povečana vsebnost pigmentov	cianobakterije	+	n. d.	n. d.	+	+	n. d.
	zelene alge	+	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

n. d. - ni določeno

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Vplivi cikličnih peptidov na fitoplankton

Vsako neobičajno povečanje števila nekega rodu ali vrste fitoplanktonskih organizmov v vodnem okolju imenujemo cvetenje. Cvetove običajno poimenujemo po rodu oziroma vrsti, ki lahko prevladuje po številu ali celo biomasi. Poseben pomen pripisujemo škodljivim cvetenjem cianobakterij in njihovim biološko aktivnim snovem, ki jih cianobakterije ob cvetenjih proizvajajo v velikih količinah. Sproščanje teh snovi v vodno okolje ogroža druge organizme, ki prihajajo z njimi v stik, vključno s človekom. Cianobakterijska cvetenja se pojavljajo v različnih oblikah, kar je odvisno od hidroloških in meteoroloških dejavnikov. V Republiki Sloveniji najdemo vse oblike cianobakterijskih cvetov (Sedmak in Kosi, 2002). Seveda njihove različne pojavne oblike ne predstavljajo enake grožnje za okolje. Cianobakterije, ki so v vodnem telesu enakomerno porazdeljene, niso tako nevarne kot nakopičene v sorazmerno tanki plasti. Pomembno je tudi, kje se združujejo. Metalimnijski cvet, ki nastaja na določeni globini vodnega telesa, je mnogo manj nevaren kot površinski cvet, s katerim prihaja v stik veliko večje število različnih živih bitij. Tako torej ista cianobakterijska populacija v svojih različnih pojavnih oblikah predstavlja različno grožnjo za okolje. Vsako cvetenje cianobakterij se občasno pojavlja skoraj v vseh oblikah. Njihov skupni imenovalc je občasno pojavljanje v visokih koncentracijah, pa naj bo to na dnu, na površini ali nekje vmes v vodnem telesu. V razmerah, ko je stik med posameznimi celicami, kolonijami ali filamenti mnogo bolj tesen kot običajno, je tudi njihov medsebojni vpliv najbolj izrazit. Kakšen vpliv imajo različni sevi cianobakterij, oziroma njihovi produkti, na razvoj cveta in zakaj je večina cvetov na svojem vrhuncu toksična, to so vprašanja, na katera smo poskusili odgovoriti v okviru naših raziskav.

Danes je popolnoma jasno, da so cianobakterijski cvetovi, tudi kadar so monospecifični, pestre mešanice različnih kemotipov, ki proizvajajo številne točno določene biološko aktivne snovi. Med njimi so ciklični peptidi, poleg lipopolisaharidov, ki so skupni vsem bakterijam, najbolj značilni. Naše trdno prepričanje je, da moramo cianobakterijske cvetove obravnavati kot superorganizme, kjer imajo posamezni kemotipi določeno vlogo, ki je v prid celotni združbi (Sedmak in Kosi, 2002). To hipotezo potrjuje tudi dejstvo, da se različnost kemotipov ohranja, ne samo v teku razvoja cveta, temveč tudi ob vsakem sezonskem pojavljanju cianobakterij.

Cianobakterije proizvajajo ciklične peptide v razmeroma velikih količinah kljub potratnosti z energijskega stališča. Večina avtorjev označuje te snovi za sekundarne metabolite, to je snovi, ki niso nujne za normalno rast, razvoj in reprodukcijo organizma. Vsekakor morajo imeti ciklični peptidi neko pomembno vlogo, da so se v evolucijskem razvoju tako dolgo ohranili praktično nespremenjeni (Rantala *in sod.*, 2004). Ciklične peptide proizvajajo v identični obliki številne morfološko in fiziološko različne družine, rodovi in vrste cianobakterij. Kakšna bi lahko bila njihova vloga ob nastanku cianobakterijskih cvetov smo poskusili razložiti z našimi poskusi. Osredotočili smo se na vplive predstavnikov depsipeptidov (PP), cikličnih peptidov z ureido vezjo (AnP B) in mikrocestinov (MC). Vse

tri skupine so si podobne, tako po molekulski masi kot po ciklični strukturi, neobičajnih aminokislinah in vezeh med njimi. Podatki v literaturi kažejo, da je vsebnost cikličnih peptidov v cianobakterijskem cvetu velika; npr. cvet *Planktothrix rubescens* iz Blejskega jezera vsebuje ~ 0,4 % planktopeptinov in anabaenopeptina B (Grach-Pogrebinsky *in sod.*, 2003) ter ~ 2 % mikrocinov (Sedmak in Kosi, 1997 a). Ciklične peptide najdemo ne samo v celicah cianobakterij, ki jih proizvajajo, temveč tudi v njihovem okolju, neodvisno od tega, v kakšni fazi razvoja je cvet. Njihova prisotnost v vodnem okolju vpliva na vse organizme v cvetu. Najvišjim koncentracijam so posamezni organizmi izpostavljeni takrat, ko so celice skoncentrirane. To se ob cvetenju cianobakterij lahko dogaja večkrat na dan, traja lahko tudi vzdržema dlje časa, v nekaterih primerih tudi več dni ali celo mesecev (Sedmak in Kosi, 2002).

V naravi poleg različnih kemotipov sobivajo tudi različni morfotipi cianobakterij. Toksičnost sevov je pogojena s prisotnostjo genov za proizvodnjo MC (Dittmann *in sod.*, 1997) in znano je, da se sposobnost tvorbe cikličnih peptidov MC odraža tudi na morfologiji celic proizvajalk. Celice in kolonije, ki so sposobne proizvajati MC, imajo običajno večji morfotip od celic in kolonij, ki MC ne proizvajajo (Via-Ordorika *in sod.*, 2004; Jungman *in sod.*, 1996; Kato *in sod.*, 1991; Watanabe *in sod.*, 1991). Vendar analiza teh morfoloških značilnosti ne more v celoti nadomestiti kvantitativne analize (Via-Ordorika *in sod.*, 2004). Tudi v našem primeru so celice, ki proizvajajo MC, večje v primerjavi s tistimi, ki MC ne proizvajajo (Slika 16 in 17).

Čeprav so razlike med dogajanjem v naravi in laboratorijskimi poskusi velike, smo v naših poskusih skušali posnemati razmere v naravi. V rastni komori smo uravnali primerno temperaturo in nizko osvetlitev, podobni kot sta v cianobakterijskem cvetu. Izbrali smo tiste fitoplanktonske organizme, ki se pojavljajo v okoljih, kjer so cvetenja cianobakterij pogosta. Poleg različnih sevov cianobakterije *M. aeruginosa*, ki se razlikujejo v sposobnosti tvorbe MC, smo izbrali še zeleno algo *S. quadricauda*, ki je redno prisotna v evtrofnih vodnih telesih, kjer so cvetenja cianobakterij pogosta (Lin, 1972). V poskusih smo uporabili kulture različnih gostot, saj smo dokazali, da gostota kulture ne vpliva bistveno na proliferacijo (Slike 12, 13 in 14) ter na velikost celic (Sliki 16 in 17). Prav tako ne vpliva na vsebnost fotosinteznih pigmentov na celico in na  $F$  teh pigmentov. Iz teh rezultatov sklepamo, da v intervalu  $10^4 - 10^7$  celic/ml, ne prihaja do spremenjenih razmer zaradi različnih gostot kultur in da je merjenje vplivov na celice v tem intervalu primerno. V naravi je gostota celic v cvetu lahko veliko večja, tudi do  $10^{11}$  celic/ml.

Iz kultur cianobakterij smo s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti izolirali in določili različne ciklične peptide in proučevali njihovo delovanje na izbrane fitoplanktonske organizme. S pomočjo masne spektroskopije smo potrdili molekulsko maso cikličnih peptidov in njihovo čistost. Najvišji vrhovi predstavljajo molekule, ki so nabite  $[M+Na]^+$  (Slika 59).

Da bi čim bolje posnemali razmere v naravi, smo za poskuse izbrali primerne koncentracije cikličnih peptidov ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$  M). Variabilnost koncentracij cikličnih peptidov v površinskih vodah je lahko zelo velika in je odvisna predvsem od prisotnosti cianobakterijskih vrst, ki jih proizvajajo, a tudi od številnih drugih fizikalnih in kemijskih dejavnikov. Čeprav ciklične peptide v vodi zasledimo v vseh stopnjah razvoja cianobakterijskega cveta, so koncentracije cikličnih peptidov na površini vodnega telesa



običajno nizke, z izjemo posebnih okoliščin, kot je npr. liza cianobakterijskega cveta. V cianobakterijskem cvetu lahko v vodi raztopljeni MC dosežejo koncentracije do 5,6  $\mu\text{g MC/l}$  (Ueno *in sod.*, 1996). Znotrajcelične koncentracije cikličnih peptidov so, v primerjavi z zunajceličnimi, zelo visoke (Park *in sod.*, 1998) in primerljive z vsebnostjo klorofila *a* (Sedmak in Kosi, 1997 a in b), ki je ključnega pomena za fotoavtotrofe. Kljub podobni vsebnosti se MC in klorofil *a* bistveno razlikujeta v molarni koncentraciji. Klorofil *a* ima namreč ~500-krat večjo molekularno maso od MC, zato enaka vsebnost teh dveh molekul v cianobakterijski celici pomeni  $5 \times 10^{-3}$  molov/l za MC in samo  $1 \times 10^{-5}$  molov/l za klorofil *a*. Večina MC se v celici nahaja v območju tilakoidnih membran, manjši del v območju nukleoplazme, preostali del pa je povezan z vsemi večjimi vključki, kot so polifosfatna telesca ipd. (Young *in sod.*, 2005). Nekateri menijo, da so za prenos MC iz celice odgovorni posebni prenašalci. Najbolj verjetno je to protein McyH, ki pripada skupini ABC transporterjev, kar nakazuje na vlogo tega proteina v transportu MC. Zanimivo je, da so cianobakterije z manjkajočim genom *mcyH* ( $\Delta\text{mcyH}$ ) imele običajno transkripcijo genov za MC, vendar ni prišlo do biosinteze MC, kar kaže na tesno povezavo prenašalca McyH z biosintezo MC (Pearson *in sod.*, 2004). Čeprav je prehod MC, bodisi aktiven bodisi pasiven, iz cianobakterijskih celic v eksponentni fazi rasti minimalen, le ~1 % (Ueno *in sod.*, 1996; Tsuji *in sod.*, 1996; Tsuchiya in Watanabe, 1997), je vpliv na okoliške celice, cianobakterije in druge fitoplanktonske organizme, lahko velik. Zanimivo je, da je sproščanje MC neodvisno od prisotnosti mikroorganizmov, ki so povezani s cianobakterijami (Sivonen, 1990). Ne smemo pozabiti, da so fitoplanktonski organizmi kronično izpostavljeni cikličnim peptidom. Poleg tega so lokalne koncentracije v mikrookoljih lahko višje od tistih, ki so jih izmerili v povprečnem vzorcu, saj so celice v neposredni bližini celic proizvajalk izpostavljene višjim koncentracijam cikličnih peptidov v primerjavi z bolj oddaljenimi celicami. Naš zaključek je, da je skoraj vsaka koncentracija primerna za testiranje učinkov, od mejne WHO vrednosti 1  $\mu\text{g/l MC-LR}$  ekvivalentov (WHO, 1998), kar je  $\sim 10^{-9}$  M, do znotrajceličnih koncentracij  $\sim 5 \times 10^{-3}$  M (izračunano po podatkih iz Reynolds, 1984; Sedmak in Kosi, 1997 a in b).

V laboratorijskih razmerah imajo posamezne fitoplanktonske vrste in sevi v eksponentni fazi rasti določeno in stalno hitrost proliferacije. Hitrost se spremeni oz. upočasi le v fazi prilagajanja na novo okolje in kadar se kultura približuje stacionarni fazi rasti (Slike 12, 13 in 14). Glede na to bi lahko pričakovali, da bodo vrste s krajšim generacijskim časom prevladale. Prav nastanek cianobakterijskih cvetov ovrže to predpostavko. Cianobakterije v evtrofnih razmerah prevladajo nad zelenimi algami navkljub daljšemu generacijskemu času.

Cianobakterijska cvetenja so razširjena po vsem svetu in ocenjujejo, da okoli 60 % cianobakterijskih cvetov vsebuje toksine (WHO, 2003). V Sloveniji je imelo več kot 80 % cianobakterijskih cvetov v zaključni fazi rasti visoke vsebnosti MC (Sedmak in Kosi, 2002). Zanimivo je, da so v istem vodnem telesu običajno prisotni tako toksični (Carmichael in Falconer, 1993; Via-Ordorika *in sod.*, 2004) kot netoksični (Kurmayer *in sod.*, 2002) sevi cianobakterij. Kljub temu, da so dejavniki, ki vplivajo na proliferacijo monokultur cianobakterij dobro raziskani (Chorus in Bartram, 1999), ostajajo neznanka dejavniki, ki vplivajo na prevlado toksičnih sevov nad netoksičnimi. V primeru sočasne gojitve dveh cianobakterijskih sevov, ki se razlikujeta po proizvodnji MC in imata podobno dinamiko delitev, prihaja do prevlade enega seva, ki pa drugega nikoli

popolnoma ne izrine. Čeprav med sevi iz rodu *Microcystis*, ki proizvajajo MC, in sevi, ki jih ne, ni velikih razlik v hitrosti rasti (Slike 12, 13 in 14), je pomembno, da so celice proizvajalke večjega morfotipa in zato tvorijo večjo biomaso. Kadar v naravi pride do cvetenja, sta biomasa in biovolumen celic za prevlado celo bolj pomembna od hitrosti delitve celic (Slika 15). Četudi nek sev prevladuje številčno, lahko nek drugi sev močno prevladuje glede na biomaso (Sliki 19 in 20).

Zanimiva je primerjava parametrov rasti dveh cianobakterijskih sevov *M. aeruginosa*, ki se razlikujeta po proizvodnji MC, in njune mešanice, kadar gojimo seva sočasno. Pri nizkih intenzitetah svetlobe se izkaže, da čeprav je število celic v mešanici manjše kot število v posameznih monokulturah (Slika 19 B), lahko volumen mešanice pri visokih gostotah preseže volumen posamezne monokulture (Slika 20 B). Glede na hitrost delitve posamezne monokulture bi bil izračunan odstotek seva, ki proizvaja MC, 14-ti dan poskusa 40 % pri višji in 55 % pri nižji osvetlitvi. Glede na volumen posamezne kulture pa bi bil odstotek seva, ki proizvaja MC, 70 % pri višji in 80 % pri nižji osvetlitvi. Celoten biovolumen mešanice ( $\mu\text{m}^3/\text{ml}$ ) je namreč odvisen od tega, koliko večjih in koliko manjših celic jo sestavlja (Slika 20). Mešanica obeh kultur kaže na začetku poskusa veliko variabilnost volumnov posameznih celic, proti koncu poskusa se vrednosti povprečnih volumnov pomikajo proti večjim, zmanjša se tudi variabilnost (Slika 21). Ni še jasno ali celice v mešanici, ki so med poskusom večje, pripadajo samo večjemu morfotipu, ki proizvaja MC ali tudi morfotipu, ki MC ne proizvaja. Vsekakor je zelo verjetno, da celice proizvajalke preko cikličnih peptidov pozitivno vplivajo tudi na volumen celic neproizvajalk (Sedmak in Eleršek, 2005; Preglednici 7 in 10). Dejstvo je, da je volumen celic tesno povezan s prisotnostjo MC (Slike 48, 49 in 51). Ne glede na to, da v mešanici dveh populacij cianobakterijskih sevov bolje uspeva tisti sev, ki tvori MC, lahko rečemo, da pri mešanicah ne gre v vsakem primeru le za aritmetični seštevek dveh različnih monokultur, temveč za drugačno kvaliteto vsote teh kultur.

Medsebojni vpliv celic proizvajalk in neproizvajalk se kaže tudi v proizvodnji MC. Čeprav celice proizvajalke prevladajo nad neproizvajalkami, jih ne izločijo. Kaže, da celice neproizvajalke vplivajo na proizvajalke tako, da proizvajajo bistveno več MC, kot bi jih v monokulturi (Slika 25, stolpci). Kadar zmešamo enako, vendar majhno število celic proizvajalk in neproizvajalk, celice neproizvajalke hitreje dosežejo svojo optimalno hitrost delitve, ker imajo pri nizkih gostotah, v primerjavi s celicami proizvajalkami, krajšo fazo prilagajanja (Slika 12 A in 13). Biovolumen mešanice se poveča šele v gostejši kulturi, ko tudi celice proizvajalke, ki so večjega morfotipa, dosežejo svojo optimalno hitrost delitve (Slika 25). Pri visokih gostotah se v mešanici poveča tudi  $F$  fotosinteznih pigmentov na ml in celo preseže izračunano vrednost  $F$ , ki bi ustrezala mešanici, ki jo sestavlja enako število celic proizvajalk in neproizvajalk (Slika 24). Zanimivo je, da se vsebnost klorofila in  $F$  fikocianinov na celico med mešanico in monokulturama razlikujejo le zaradi razlik v velikosti celic (Sliki 22 in 23). To je še posebej razvidno pri preračunu na volumsko enoto celice, s čimer upoštevamo razlike v velikosti celic (Slika 22 B). Opaženi medsebojni vplivi različnih sevov cianobakterij potrjujejo, da med različnimi sevi ne gre za princip kompeticijskega izključevanja, temveč za namnožitev seva, ki v določenih razmerah uspeva bolje in hkrati omogoča soobstojanje drugih sevov (Sedmak in Kosi, 1998). S poskusom, kjer so bili sevi, ki proizvajajo MC in sevi, ki jih ne, ločeni z membrano, skozi katero je prehajalo le gojišče, ne pa tudi celice, so dokazali, da sev, ki proizvaja MC,

inhibira sev, ki MC ne proizvaja (Schatz *in sod.*, 2005). Ni potrjeno, da pride do inhibicije zaradi MC. Zanimivo je, da celice proizvajalke inhibirajo proliferacijo celic neproizvajalk, vendar jih ne izločijo ali uničijo. Domnevamo, da morajo obstajati snovi, ki se v zadostnih količinah sproščajo v okolje in s katerimi celice proizvajalke in ne-proizvajalke vplivajo ene na druge. Glede na dejstvo, da gram-negativne bakterije, kamor prištevamo tudi cianobakterije, za zaznavanje celične gostote (QS) uporabljajo predvsem peptide, sklepamo, da je vloga cikličnih peptidov povezana z mehanizmi QS. To hipotezo podpirajo tudi genetske študije genov *mcy* (Dittmann in Erhard, 2001). Z upoštevanjem vseh teh dejstev lahko predpostavljamo, da so poleg običajnih fizioloških in morfoloških posebnosti ter fizikalno-kemijskih dejavnikov v okolju prisotni še drugi dejavniki, ki vplivajo na rast in konkurenčnost. To je v nasprotju z modelom, ki predpostavlja, da je vsebnost MC, kadar v okolju primanjkuje dušika, odvisna samo od proliferacije določenega seva cianobakterij (Long *in sod.*, 2001). Menimo, da so ciklični peptidi, ki se v okolje izločajo med nastajanjem cianobakterijskih cvetov, pomemben dejavnik, ki vpliva na nastanek in razvoj cianobakterijskega cveta.

Pokazali smo, da ciklični peptidi mikrocistinskega tipa, kadar so prisotni v vodnem okolju, povzročajo povečanje volumna različnih fitoplanktonskih organizmov. Z manjšimi razlikami v časovni dinamiki imajo različni tipi MC podoben vpliv (Preglednica 7). Vpliv [D Asp<sup>3</sup>]MC-RR na povečanje volumna je dobro viden tudi pri zeleni algi (Slika 49). Podobne učinke na to zeleno algo ima tudi MC-LR (Eleršek, 2001). Cianobakterijske celice, ki jih izpostavimo delovanju MC, kažejo povečanje volumna tudi pri vsakem ponovnem dodatku v medij (Sedmak in Eleršek, 2005). Vpliva cikličnih peptidov PP in AnP B na povečanje volumna fitoplanktonskih organizmov nismo opazili (Preglednica 10).

Cianobakterije vrste *M. aeruginosa* se v laboratorijskih razmerah zaradi prisotnosti MC, združujejo v skupke (Slika 44 in 45). Primerljiv fenomen najdemo v starih enoceličnih kulturah cianobakterij, ki proizvajajo MC, ko kulture dosežejo visoke gostote. Za razliko od MC, pri delovanju PP in AnP B ni opaziti združevanja cianobakterij (Slika 60 A in B). Opazili pa smo povečano združevanje cenobijev zelene alge *S. quadricauda* zaradi prisotnosti PP (Sliki 60 C, D in 63 B). Naše ugotovitve o združevanju fitoplanktonskih organizmov zaradi dodatka cikličnih peptidov imajo velik pomen za dogajanje v naravi. Spremembe v morfologiji in fiziologiji fitoplanktonskih organizmov lahko ogrozijo njihov obstoj, ker se s tem poveča hitrost usedanja (Smayda in Boleyn, 1965). Prednost imajo tisti fitoplanktonski organizmi, ki so sposobni aktivnega premikanja, bodisi s sistemi za uravnavanje plovnosti bodisi s strukturami, ki omogočajo aktivno premikanje. Čeprav je gibanje fitoplanktona odvisno predvsem od gibanja vodnih mas, imajo planktonske cianobakterije zelo učinkovite sisteme za uravnavanje plovnosti (Walsby, 1994). Združevanje cianobakterij zaradi prisotnih cikličnih peptidov povzroči še večje, lažje in hitrejše migracije cianobakterijskih celic. V primernih razmerah so se cianobakterije sposobne v zelo kratkem času (čez noč) skoncentrirati več kot 1000-krat (Reynolds, 1998). Ob obali, proti kateri piha vetrovi, se celice še dodatno zgoščujejo in tako oblikujejo cianobakterijske gošče (Chorus in Bartram, 1999). Poleg tega nastanek večjih oblik oz. kolonij omogoča bolj učinkovito izkoriščanje svetlobe in ščiti pred izsušitvijo (Bucka, 1989; Utkilen in Gjølme, 1992). Inducirano združevanje drugih fitoplanktonskih organizmov, ki nimajo mehanizmov uravnavanja plovnosti, zaradi prisotnih MC in v manjši meri tudi PP, povzroči, da organizmi tonejo, kar jim onemogoča tekmovanje za

svetlobo. Poznamo tudi izjeme kot je npr. zelena alga *S. quadricauda* (Slika 46 in 47), ki je vztrajno prisotna tudi v toksičnih cianobakterijskih cvetovih. Razlog za vztrajno prisotnost bi lahko bil tudi, da imajo celice te alge podaljšane strukture (spine), s katerimi se lahko pripnejo oz. zapletejo v cianobakterijski cvet in tako skupaj z večjimi cianobakterijskimi kolonijami potujejo z vzgonom. Dodaten vpliv združevanja je, da so veliki planktonski skupki težje dostopni predatorjem in filtratorjem (Haney, 1987; Gliwicz, 1990), kar še dodatno razloži njihovo vztrajanje v cianobakterijskem cvetu. Povečane dimenzije fitoplanktonskih organizmov in njihovo povečano združevanje sta dve glavni značilnosti, ki jih povzroči prisotnost cikličnih peptidov v okolju in jih cianobakterije lahko uporabijo sebi v prid. Prisotnost MC in PP lahko na ta način še dodatno zmanjšuje biotsko pestrost, ki je v hepatotoksičnih cianobakterijskih cvetovih izredno nizka (Sedmak in Kosi 1998; 2002).

Povečanje rasti fitoplanktonskih organizmov se lahko odraža na dva različna načina: poveča se hitrost delitve ali pa se poveča biovolumen. Cianobakterije, kot tudi ostali organizmi, imajo precejšnja nihanja v celičnem volumnu pri normalni rasti in delitvi. Tik pred delitvijo celica doseže svojo maksimalno velikost in po delitvi iz nje nastaneta dve manjši celici. V naravnih okoljih zato najdemo veliko variabilnost v velikosti celic, kar nam oteži ugotavljanje vpliva na volumen celic. Povečanje biovolumna je lahko posledica povečane biomase ali sprememb v propustnosti membrane, pri čemer pride do nabrekanja celic. Pri povečanju biomase gre lahko za povečanje mase na račun znotrajcelične sinteze oz. anabolizma ali za povečano proliferacijo. V primeru delovanja cikličnega peptida MC gre pri povečanju biovolumna za vpliv na anabolizem, kar se odraža tudi v povečanju količine fotosinteznih pigmentov (Slika 58). Ciklični peptid PP vpliva na povečanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov (Slika 66), vendar tega pojava ne spremlja tudi povečanje volumna celic.

Selektivna fitotoksičnost PP (Slika 61) in AnP B (Slika 62) je nova lastnost, ki lahko pomaga razložiti procese nastanka in razgradnje cianobakterijskega cveta. Vpliv ni povezan s sposobnostjo tvorbe MC (Preglednica 8). PP v nizki koncentraciji  $10^{-8}$  M inhibira delitev občutljivega seva *M. aeruginosa*, medtem ko je za zaviranje zelene alge *S. quadricauda* potrebna 10-krat višja koncentracija. Nekateri sevi cianobakterij so neobčutljivi tudi na prisotnost zelo visokih koncentracij PP v okolju (Slika 61 B). Selektivno toksičnost pri različnih sevih *Microcystis* lahko razložimo z razlikami v prepustnosti membrane in mukoznih ovojev. Za razliko do delovanja PP in AnP B, MC pri nizkih intenzitetah svetlobe v končni koncentraciji  $5 \times 10^{-7}$  M pozitivno vplivajo na hitrost delitve zelene alge *S. quadricauda* in cianobakterij *M. aeruginosa*; tako na seve, ki proizvajajo MC kot na seve, ki jih niso sposobni proizvajati. Pri višjih koncentracijah, še posebej pri višjih intenzitetah svetlobe, MC zavirajo rast fitoplanktonskih organizmov (Sedmak in Kosi, 1998). Algicidno aktivnost MC-LR v koncentraciji  $5 \times 10^{-6}$  M so potrdili tudi Singh *in sod.* (2001). MC-LR je fitotoksično vplival na kulture alg in cianobakterij (*Nostoc*, *Anabaena*), ni pa imel vpliva na bakterije in glive. Hu *in sod.* (2004) poročajo, da tudi MC-RR v koncentracijah nad  $10^{-7}$  M inhibira proliferacijo cianobakterije *Synechococcus elongatus*.

Citolitično aktivnost PP pri občutljivem sevu cianobakterij (Slika 61 A) je spremljala hitra biotransformacija PP (Preglednica 9). V mediju zelene alge *S. quadricauda* se PP počasneje transformira/metabolizira, produkte smo našli le v nizkih koncentracijah

(Preglednica 9), kar sovpada z manjšo citotoksičnostjo. Niti najvišja koncentracija PP ni povzročila lize celic (Slika 61 C). V supernatantu cianobakterijskega seva, ki je bil na delovanje PP neobčutljiv (Slika 61 B), ni prišlo do zmanjšanja koncentracij PP, niti do tvorbe novih produktov. Večja topnost produktov, ki se odraža v krajših zadrževalnih časih, nakazuje, da gre lahko za produkte razpada, razgradnje ali detoksikacije. Možno je, da šele produkti razgradnje/razpada PP povzročijo citotoksični učinek. Splošno znano je, da snovi s presnovo postanejo bolj topne in tako lažje prehajajo v celice.

Ugotovili smo, da prihaja v fitoplanktonskih organizmih do izražanja delovanja cikličnih peptidov šele, ko se fitoplanktonske celice pričnejo deliti. Prezem MC v cianobakterijsko celico poteka na svetlobi in v temi (Singh *in sod.*, 2001). Vse kaže, da morajo ciklični peptidi vstopiti v celico, da pride do njihovega delovanja. Ob delitvi se v celici vključijo specifični fiziološki procesi, kot npr. spremembe v citoskeletu, kjer imajo fosforilaze in fosfataze ključno vlogo. Mnogo cikličnih peptidov namreč inhibira proteinske fosfataze. Obstaja dokaz za nespecifično translokacijo različnih majhnih oligopeptidov, sestavljenih iz 4 do 11 aminokislilin, skozi membrano (Oehlke *in sod.*, 1997). Čeprav so izbrani ciklični peptidi podobnih velikosti, zaenkrat ne vemo, ali prehajajo v fitoplanktonske celice aktivno ali pasivno. Lahko bi prehajali npr. med delitvijo celic, ko se celični ovoji tvorijo na novo.

Različni fizikalno-kemijski dejavniki lahko povzročijo stres, ki se pri fototrofih odraža tudi na nivoju fotosinteze. Vsebnost in  $F$  fotosinteznih barvil določenega seva cianobakterij je odvisna od osvetlitve, pri kateri sev raste (Preglednica 5). Značilno povečanje vsebnosti in  $F$  fotosinteznih pigmentov kaže na stres. Stres povzroči tudi prisotnost biološko aktivnih snovi v okolju. Pri cianobakterijah, kot tudi pri drugih avtotrofih, so fotosintezni sistemi tesno povezani z drugimi glavnimi metabolnimi potmi, zato smo predpostavili, da se delovanje cikličnih peptidov odraža posredno ali neposredno tudi na fotokemizmu. Znano je, da je povečana  $F$  fotosinteznih pigmentov, klorofila in fikocianinov, obratno sorazmerna s stopnjo fotosinteze (Kolber *in sod.*, 1990). Povečana  $F$  je lahko posledica višje koncentracije pigmentov, odsotnosti funkcionalne povezave aktivnih centrov ali prisotnosti različnih neaktivnih oblik (Campbell *in sod.*, 1998). Zato je za interpretacijo rezultatov o  $F$  fotosinteznih pigmentov pomembno razlikovati funkcionalnost in dezintegracijo fotosistemov v fotosinteznem aparatu. Fizikalni stresni dejavniki, kot sta npr. ultrazvok in zamrzovanje, dezintegrirajo celične elemente, vendar je mogoče, da so na delih membran fotosistemi še vedno funkcionalno povezani, medtem ko Triton X-100 s svojim detergenskim delovanjem povzroči lizo membran. V tem primeru fotosistemi ne morejo biti funkcionalno povezani.

Lee *in sod.* (1994) so objavili, da naj bi bila povezava med  $F$  in številom celic linearna v intervalu od  $1 \times 10^3$  do  $1 \times 10^7$  celic/ml. Dokazali smo, da je pri izbranih cianobakterijskih sevih povezava med številom celic in  $F$  ali vsebnostjo pigmentov linearna v intervalu od  $1 \times 10^5$  do  $5 \times 10^6$  celic/ml (Slike 7-11). V tem intervalu je zato upravičeno tudi preračunavanje  $F$  ali vsebnosti pigmentov na celico oz. na volumsko enoto celice. Vzorce smo pred merjenjem s fluorimetrom hranili v temi, da so celice imele minimalno  $F$  (Campbell *in sod.*, 1998), saj smo le tako lahko izmerili realno maksimalno  $F$ , ki jo povzroči biološko aktivna snov. Relativne enote, s katerimi merimo  $F$ , so pri  $F$  fikocianinov  $\sim 10$ -krat višje kot pri  $F$  klorofila (Slika 18). Za kontrolo fluorimetrične metode in ekstrakcije pigmentov nam je služil podatek, da vsebuje celica *M. aeruginosa* povprečno od 0,26 do 0,43 pg klorofila *a* (Reynolds, 1984), kar je skladno z našimi

rezultati. Potrdili smo tudi opažanja, da pri fitoplanktonskih organizmih pride do dušenja fotosinteze, kadar kultura vsebuje več kot 4  $\mu\text{g}$  klorofila *a* na ml (Eullaffroy in Vernet, 2003).

Razmerje  $F_{\text{FS II}}/F_{\text{FS I}}$  se pogosto uporablja kot indikator učinkovitosti fotosinteznega aparata (Eullaffroy in Vernet, 2003). Povečanje tega razmerja gre lahko na račun povečanja  $F_{\text{FS II}}$  ali na račun zmanjšanja  $F_{\text{FS I}}$ . Tretja možnost, ki pa se ne pokaže v spremembi razmerja, je povečanje ali zmanjšanje  $F$  v obeh FS, kar nam lahko da lažni vtis o homeostazi. Zato smo analizirali  $F_{\text{FS II}}$  in  $F_{\text{FS I}}$  posamično in tudi kot prispevek  $F$  vsakega FS k njenemu razmerju. Analizirali smo tudi  $F$  fikocianinov. Ugotovili smo, da je za vzbujevanje  $F$  klorofila pri cianobakterijah bolj primerna  $\lambda_{\text{ex}}$  440 nm, pri zelenih algah pa  $\lambda_{\text{ex}}$  480 nm.

Čeprav prisotnost cikličnih peptidov cianobakterij v okolju v splošnem poveča  $F$  fitoplanktonskih organizmov, niso vsi enako in na enak način občutljivi. Prisotnost cikličnih peptidov se kaže v povečani avtofluorescenci izbranih fitoplanktonskih organizmov (Slike 44 C in D, 45, 47, 50 in 63). Pri zeleni algi *S. quadricauda* je prišlo do povečanja  $F_{\text{FS I}}$ , tako zaradi prisotnosti PP (Slika 65 C) kot zaradi MC (Slika 53), zato razmerje  $F_{\text{FS II}}/F_{\text{FS I}}$  pada (Slika 52). Pri občutljivih sevih cianobakterij je zaradi prisotnosti MC in PP prišlo do povečanja  $F$  tako  $F_{\text{FS II}}$  kot  $F_{\text{FS I}}$  (Slike 54, 56, 65 A), zato je razmerje ostalo nespremenjeno. Vpliv MC in PP je viden tudi v povečanju  $F$  fikocianinov (Slike 55, 57 in 64 A). Vpliv PP na povečanje  $F$  cianobakterij je časovno različen, odvisen je od koncentracije PP in izbranega seva. Učinek na  $F$  lahko zaznamo že drugi dan poskusa (Sliki 40 in 41) ali pa se pokaže šele z zakasnitvijo od četrtega dne dalje (Sliki 64 A in 65 A). Odsotnost opaznega vpliva AnP B na  $F$  fikocianinov in klorofila kaže na drugačno delovanje AnP B v primerjavi s PP in MC. Pri zeleni algi *S. quadricauda* smo zaradi prisotnosti MC opazili tudi nehomogeno razporejanje klorofila (Sliki 50 in 51).

Eno izmed pomembnih vprašanj, ki smo si ga zastavili glede izjemno visoke  $F$  celic izpostavljenih MC in PP, je bilo, ali je povišana  $F$  posreden oz. splošen odziv celic zaradi razpada določenih komponent oz. lize celic ali pa gre za specifično delovanje na fotosintezni aparat. Nespecifičen odziv bi bil lahko primerljiv z odzivi, ki so posledice obdelovanja z detergentom (Slike 27, 32 in 33), zamrzovanjem (Slike 29, 42 in 43) ali ultrazvokom (Slike 26, 30 in 31). Medtem ko bi bil specifičen odziv lahko primerljiv z delovanjem specifično usmerjenimih inhibitorjev kot so inhibitor fotosinteze DCMU (Slike 28, 29, 36, 37, 42 in 43), inhibitor dihanja KCN (Slike 28, 34, 35, 36 in 37) ali inhibitor sinteze celične stene bacitracin (Sliki 38 in 39). Opazili smo, da so hitri vplivi na povečanje  $F$  fotosinteznih pigmentov zaradi stresnih dejavnikov časovno zelo različni (začetni dvig  $F$  je označen s puščicami na Slikah 30, 31, 40, 41, 42 in 43). Zaradi delovanja vseh stresnih dejavnikov je prišlo do povišane  $F$  klorofila in fikocianinov, vendar nikjer nismo opazili tako izrazito povečane  $F$  kot pri dodatku MC in PP (Preglednica 6). Zanimiva je primerjava delovanja splošnega in specifičnega stresnega dejavnika. Zamrzovanje v kombinaciji z DCMU pospeši lizo celic (Slika 29), kar se odraža tudi s povišano  $F$  klorofila (Slika 42) in fikocianinov (Slika 43). Vidni so hitri in zakasneni vplivi. Menimo, da je močno povišana  $F$  posledica propada celic, kar je podobno delovanju cikličnega peptida PP.

Drugačna časovna dinamika povečanja *F* klorofila zaradi dodatka PP v kombinaciji z inhibitorjem dihanja KCN kaže, da je vpliv kombinacije večji kot ga povzroči vsak stresni dejavnik zase (Slika 40). Poleg tega kombinacija PP in KCN drugi dan poskusa značilno poveča tudi *F* fikocianinov (Slika 41). Treba je poudariti, da fotosinteza in dihanje pri cianobakterijskih celicah nista prostorko ločena in zato bolj tesno povezana procesa kot pri evkariontskih algah, zato se prekinitev dihalne verige s KCN neposredno odraža s spremembo *F*. Pri cianobakterijah terminalna in alternativna citokrom oksidaza tekmujeta za elektrone s FS I (Bücher *in sod.*, 1998). Glede na rezultate lahko trdimo, da ciklični peptidi ne delujejo neposredno niti na FS II tako kot DCMU niti na dihalno verigo kot KCN niti tako kot drugi nespecifični postopki, ki močno vplivajo na fiziologijo celic in s tem na *F* fotosinteznih pigmentov.

Zaradi prisotnosti cikličnih peptidov v okolju pride tudi do povečane tvorbe fotosinteznih pigmentov. Ciklični peptid PP pri občutljivem sevu cianobakterij poviša vsebnost klorofila na celico (Slika 66). V zelenih algah se zaradi prisotnosti MC poveča vsebnost klorofila *a* celo na  $\mu\text{m}^3$  celice (Slika 58 A). Cianobakterije se na različne osvetlitve prilagajajo bolj z vsebnostjo fikocianinov in manj z vsebnostjo klorofila (Slika 10 in 11), zato ni presenečenje, da je v cianobakterijah zaradi prisotnosti MC izrazito predvsem povečanje vsebnosti fikocianinov na celico (Slika 58 B). Povečanje vsebnosti pigmentov na celico in na enoto celičnega volumna kaže na udeležbo MC v znotrajceličnih procesih. Biološko aktivnost MC na nivoju kompleksov za zbiranje svetlobe lahko interpretiramo kot signal, ki napoveduje poslabšanje svetlobnih razmer zaradi masovnega razvoja cianobakterij. Da so MC povezani s pigmenti, potrjujejo tudi poskusi z *mcyB*<sup>-</sup> mutanto *M. aeruginosa*. Mutante, ki ne morejo proizvajati MC, proizvajajo tudi manj pigmentov kot divji sev (Hesse *in sod.*, 2001).

Ni še znano, kako je aktivnost cikličnih peptidov, ki so inhibitorji proteinskih fosfataz, povezana z vključevanjem v metabolizem cianobakterij (MacKintosh *in sod.*, 1990). Fosforilacija različnih komponent kompleksa za lovljenje svetlobne energije je namenjena kontroli razporeditve vzbujevalne energije med FS I in FS II kot del mehanizma za učinkovitejšo uporabo fotonov (Allen, 1992). Reverzibilna fosforilacija jedra FS II je pogosto orodje za študij regulacije metabolizma v rastlinah in jo uravnava svetloba (Giardi *in sod.*, 1995). Zanimivo je, da je vpliv PP povezan s svetlobo. V odsotnosti svetlobe nismo opazili večjih vplivov PP (Slika 67).

Pri cvetenju cianobakterij v vodnih telesih prihaja do bistvenih sprememb fizikalno-kemijskih dejavnikov: npr. zmanjšanja prodiranja svetlobe, občasnega pomanjkanja kisika, spremembe pH. Poleg tega cianobakterije sproščajo v vodno okolje tudi ciklične peptide. Čeprav je vpliv cikličnih peptidov cianobakterij, MC, PP in AnP, v koncentracijah, ki jih najdemo v naravnih okoljih, na posamezno morfološko ali fiziološko komponento nekega fitoplanktonskega organizma razmeroma majhen, ima lahko vsota vseh vplivov velik in pomemben vpliv na celotno fitoplanktonsko združbo.

Razmere v cianobakterijskem cvetu so v prid cianobakterijam. Cianobakterije so sposobne izkoriščati nižje intenzitete svetlobe kot drugi fitoplanktonski organizmi. To dosežejo s pomočjo fikobilisomov in povečanjem vsebnosti klorofila na celico (Herzig in Dubinsky, 1992). Kot smo videli, se zaradi delovanja MC poveča hitrost rasti in biovolumen, inducira se združevanje celic in kolonij ter pride do dodatnega povečanja vsebnosti fotosinteznih

pigmentov. S temi fiziološkimi in morfološkimi spremembami lahko cianobakterijske celice in kolonije bolje in lažje nadzirajo položaj v vodnem stolpcu, kar jim omogoča še večjo razrast. Kot vidimo, imajo cianobakterije, ki proizvajajo in izločajo ciklične peptide, dodatno ekološko prednost v tekmi za hranila, svetlobo in prostor. Zanimivo je, da so tudi cianobakterije, ki same proizvajajo MC, občutljive na raztopljene MC, ki jih dodamo v njihovo okolje. Iz tega sklepamo, da se vloga MC v celicah, ki jih proizvajajo, razlikuje od vloge, ki jo imajo MC v neposrednem okolju.

Po drugi strani se razmere v cianobakterijskem cvetu poslabšajo za večino ostalih fitoplanktonskih organizmov. Občutljivejši organizmi težko uspevajo že zaradi slabih svetlobnih razmer in prisotnosti različnih alelopatskih snovi (Hagmann in Jüttner, 1996) oz. alelopatskih interakcij (Vardi *in sod.*, 2002; Sukenik *in sod.*, 2002). Nanje negativno vpliva tudi prisotnost različnih MC (Sedmak in Kosi, 1998; Sedmak in Eleršek, 2005; Hu *in sod.*, 2004; Singh *in sod.*, 2001). Temu se pridružuje še prisotnost drugih cikličnih peptidov, ki z vplivanjem na hitrost rasti, biovolumen, fotosintezo, fotosintezne pigmente in inducirano združevanje, povzročijo v občutljivih fitoplanktonskih organizmih takšno spremembo fizioloških in morfoloških lastnosti, da ti organizmi težje vztrajajo v vodnem stolpcu. Že vpliv cikličnih peptidov mikrocininskega tipa zmanjša biotsko pestrost v vodnem telesu (Sedmak in Kosi, 1998; 2002), v vodi prisotni ciklični depsi-peptidi in ciklični peptidi z ureido vezjo pa s svojim citotoksičnim delovanjem biotsko pestrost še dodatno zmanjšujejo.

Zanimivo je, da v podobnih okoljih najdemo podobne variante cikličnih peptidov. To zveni neobičajno, še posebej ker cianobakterijski cvet sestavlja množica različnih kemotipov (Welker *in sod.*, 2004). Možnost, da se isti cianobakterijski sevi prenašajo v različna vodna telesa s pticami ali z ribištvom, so malo verjetne (Sedmak in Kosi, 1997 a in b). V cvetu *Planktothrix rubescens* v španskih zajetjih pitne vode poročajo o enakih variantah MC, skupaj z AnP B in F, kot v cvetu *Planktothrix rubescens* z Blejskega jezera (Barco *in sod.*, 2004; Grach Pogrebinsky *in sod.*, 2003; 2004). Obe jezera sta relativno veliki, globoki, oligo-mezotrofni vodni telesi, ki se uporabljata za rekreacijske namene. Tudi v grških vodnih telesih so našli MC skupaj z AnP. Menijo, da obstajajo klimatske oz. geografske značilnosti, ki vplivajo na pojavljanje toksičnih cvetenj (Gkelis *in sod.*, 2005). Trdimo lahko, da so ciklični peptidi iz cianobakterijskega cveta odsev fizikalnih, kemijskih in klimatskih razmer v določenem vodnem telesu.

### 5.1.2 Smernice in potrebe

Eden izmed pomembnih projektov združenja EUROHAB (*ang. European Initiative on Harmful Algal Blooms*) je proučevanje škodljivih cvetenj alg in cianobakterij tako v morjih kot v površinskih vodah. Razpisali so smernice za raziskovanje in raziskovalne potrebe, ki se nanašajo na interakcije v združbi fitoplanktonskih organizmov (Eurohab, 1998). Sledimo tudi smernicam Svetovne zdravstvene organizacije (WHO, 2003). Zakonodaja evropske skupnosti, ki opredeljuje kakovost kopalnih voda in postavlja kot posebno kvaliteto skrb za javno zdravje in varovanje naravnih virov, izpostavlja škodljivost fitoplanktonskih cvetenj. V okviru mednarodnega programa UNESCO obstaja tudi mreža informacij CYANONET ([www.cyanonet.org](http://www.cyanonet.org)), v katero je vključena tudi Slovenija. V tej globalni mreži se zbirajo vsi podatki o toksičnih cianobakterijah, o njihovih cvetenjih, o upravljanju z ogroženimi vodnimi viri in o načinu obveščanja in osveščanja prebivalstva.



Naše delo prispeva k boljšemu in bolj poglobljenemu proučevanju škodljivih cianobakterijskih cvetenj, saj se problematika in smer našega raziskovanja na številnih področjih pokriva z objavljenimi smernicami in raziskovalnimi potrebami. Smernice in raziskovalne potrebe EUROHAB-a, ki so povezane z našim delom, smo v nadaljevanju razprave označili s krepko pisavo. Proučujemo predvsem cianobakterijske toksine in druge biološko aktivne snovi in njihove vplive na širšo fitoplanktonsko združbo. Ugotavljamo, kakšno vlogo imajo te snovi pri kompeticiji vrst, ki oblikujejo cvet, in kako posredno ob cvetenju cianobakterij to vpliva na predatorje. Izvajamo tudi kompeticijske poskuse in kvantitativne študije privzema, skladiščenja in nadaljnje usode cianobakterijskih cikličnih peptidov, s poudarkom na nativnih vodnih organizmih, ki so izpostavljeni takim koncentracijam biološko aktivnih snovi, kot jih najdemo v naravi.

Če želimo učinkovito zaščititi površinska vodna telesa pred masovnim pojavljanjem cianobakterij in zagotoviti zdravo okolje, moramo predvsem bolje spoznati medsebojne povezave v teh biotopih in vlogo različnih biološko aktivnih snovi v njih. To delo prispeva k boljšemu razumevanju te ekološke problematike.

#### 5.1.2.1 Smernice za raziskovanje (EUROHAB, 1998)

- Kakšna je natančna vloga kompeticije za osnovne vire (svetloba, hranila) pri nastanku škodljivega cianobakterijskega cveta?
- Kakšen je pomen zmožnosti uporabe raztopljenih organskih snovi kot vira hranil pri razvoju škodljivega cianobakterijskega cveta?
- **Kako škodljive cianobakterije vplivajo na predatorje (*ang. grazers*)? Ali obstaja negativen vpliv škodljivih cianobakterij na predatorje? Ali zmanjšano število predatorjev pomaga razložiti masovno pojavljanje škodljivih cianobakterij?**
- **Kakšni so vplivi poznanih cianobakterijskih toksinov in drugih biološko aktivnih snovi na širšo fitoplanktonsko združbo?**
- **Ali lahko cianobakterijski toksini in druge biološko aktivne snovi predstavljajo kompetitivno prednost za vrste, ki oblikujejo cvet?**
- Kakšen je pomen pretvorb hranil v nastanku in vzdrževanju cveta? Ali cianobakterijske populacije pripomorejo k celokupnemu vnosu dušika v vodno telo?
- Kako so cianobakterijski toksini preneseni v višje trofične nivoje v prehranjevalni verigi in kako se odvija biomagnifikacija?
- Kakšno vlogo imajo patogeni mikrobi in paraziti fitoplanktona (bakteriofagi, virusi, bakterije, glive in protozoji) pri nastanku, razvoju in propadu škodljivega cianobakterijskega cveta?

#### 5.1.2.2 Raziskovalne potrebe (EUROHAB, 1998)

- **Sistematično eksperimentalno raziskovanje rasti (kontinuirani in semikontinuirani sistemi ter kompeticijski poskusi), da bi bolje razumeli kompetitivne zmožnosti škodljivih cianobakterij.**

- Več raziskav na področju določanja vloge organskih snovi v strukturi planktonske združbe; določiti, ali raztopljeni organski snovi vpliva na oblikovanje in/ali na toksičnost škodljivega cianobakterijskega cveta.
- Zanesljive metode za merjenje *in situ* stopnje predatorstva (*ang. grazing rates*) škodljivih cianobakterij, da bi lažje ocenili vlogo obiranja kot selekcijskega dejavnika za cianobakterije. Sistematične eksperimentalne študije prehranskega spleta na nivoju mezokozmosa.
- **Kvantitativne študije privzema, skladiščenja in nadaljnje usode cianobakterijskih toksinov, s poudarkom na nativnih vodnih organizmih, ki so izpostavljeni koncentracijam toksinov, kot jih zasledimo v naravi.**
- Ovrednotenje naravne transformacije in agregacije hranil, da bi bolje razumeli vlogo kroženja hranil pri pojavu cianobakterijskega cveta v primerjavi z antropogenim vnosom hranil.
- Zapletene povezave med škodljivimi vrstami cianobakterij in drugimi člani prehranjevalnega spleta morajo biti raziskane z ekosistemskimi modeli, ki temeljijo na fizioloških lastnostih organizmov.
- **Natančne toksinološke študije, od molekularne do populacijske ravni, morajo biti raziskane s pomočjo ekološko relevantnih združb in organizmov, da bi bolje razumeli učinke cianobakterijskih toksinov na fitoplanktonsko združbo.**

## 5.2 SKLEPI

- Stres, ki ga povzročajo ciklični peptidi cianobakterij na fitoplanktonskih organizmih, se razlikuje od stresa, ki ga povzročajo fizikalni in/ali kemijski stresni dejavniki.
- Ob združevanju celic v različne oblike cianobakterijskih cvetov so lokalne koncentracije cikličnih peptidov višje od povprečnih.
- Mikrocinov vplivajo na morfološke in fiziološke spremembe v fitoplanktonskih organizmih.
- Vloga mikrocinov v celici, ki jih proizvaja, je drugačna od vloge mikrocinov v okolju.
- Depsipeptid planktopeptin BL1125 in ciklični peptid z ureido vezjo anabaenopeptin B sta selektivno fitotoksična za fitoplanktonske organizme.
- Ciklični peptidi cianobakterij povzročajo spremembe v fotosinteznem aparatu cianobakterij. Pri delovanju planktopeptina spremembe v fotosinteznem aparatu spremlja zmanjšana hitrost delitve, medtem ko pri delovanju mikrocinov lahko pride do pospešene proliferacije.
- Biološko aktivnost mikrocinov, usmerjeno na fotosintezne pigmente, lahko razlagamo kot signal, ki napoveduje poslabšanje svetlobnih razmer zaradi masovnega pojava cianobakterij.
- Morfološke in fiziološke spremembe, ki jih povzročajo ciklični peptidi, lahko, za razliko od drugih fitoplanktonskih organizmov, cianobakterije izkoristijo sebi v prid.
- Pri cvetenju cianobakterij sta biomasa in biovolumen cianobakterijskih celic za prevlado celo bolj pomembna od hitrosti delitve. Kljub prevladi enega seva drugi ni izrinjen.
- Tvorba cikličnih peptidov je odvisna od razmer v okolju.
- Biološko aktivne snovi imajo pri cvetenju cianobakterij pomembno vlogo in vplivajo na biotsko pestrost v vodnem ekosistemu.
- Evropska zakonodaja posveča posebno pozornost cianobakterijam in njihovim biološko aktivnim snovem.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Cianobakterije, ki so sposobne cvetenja, proizvajajo velike količine cikličnih peptidov. V vodnem okolju je mnogo različnih fitoplanktonskih organizmov, ki so izpostavljeni tem biološko aktivnim snovem. Izbrali smo predstavnike treh različnih skupin cikličnih peptidov: mikrocistine kot predstavnike hepatotoksičnih cikličnih peptidov, planktopeptin BL1125 kot predstavnika depsipeptidov in anabaenopeptin B kot predstavnika cikličnih peptidov z ureido vezjo. Proučevali smo vpliv teh cikličnih peptidov na morfologijo in fiziologijo nekaterih fitoplanktonskih organizmov.

Znotrajcelične koncentracije cikličnih peptidov so v primerjavi z zunajceličnimi visoke. Ob združevanju celic v različne oblike cianobakterijskih cvetov so lokalne koncentracije cikličnih peptidov višje in imajo tako večji vpliv na organizme v okolju. *In vitro* poskusi s cikličnimi peptidi so pri nizkih intenzitetah svetlobe pokazali značilne vplive na različne fitoplanktonske organizme. Ciklični peptidi inducirajo morfološke in fiziološke spremembe tako pri cianobakterijskih sevih rodu *Microcystis*, kot tudi pri zeleni algi *Scenedesmus quadricauda*, vendar šele, ko pride do delitve fitoplanktonskih organizmov. Stres, ki ga povročajo ciklični peptidi cianobakterij na fitoplanktonskih organizmih se razlikuje od stresa, ki ga povročajo fizikalni in/ali kemijski stresni dejavniki.

Mikrocistini z vzpodbujanjem združevanja celic, povečanjem vsebnosti fotosinteznih pigmentov in povečevanjem biovolumna cianobakterij vplivajo na hitrejše in boljše nadziranje položaja cianobakterij v vodnem stolpcu, kar tem fitoplanktonskim organizmom omogoča kompeticijsko prednost pred drugimi fitoplanktonskimi organizmi. Vloga mikrocistinov v celici, ki jih proizvaja, je drugačna od vloge mikrocistinov v vodnem okolju. Mikrocistini delujejo na fotosisteme fitoplanktonskih organizmov, kar si lahko razlagamo kot signal, ki napoveduje poslabšanje prihajajočih svetlobnih razmer v cianobakterijskem cvetu. Pri kompeticiji seva cianobakterij, ki proizvaja mikrocistine, in seva, ki mikrocistinov ne proizvaja, kljub prevladi seva, ki proizvaja mikrocistine, drugi ni izrinjen. Celice neproizvajalke vplivajo na proizvajalke tako, da slednje proizvajajo bistveno več mikrocistinov, kot bi jih v monokulturi. Predpostavljamo, da so različne populacije cianobakterij v cvetu ena drugi v pomoč. Pri cvetenju cianobakterij sta biomasa in biovolumen cianobakterijskih celic za prevlado bolj pomembna od hitrosti delitve.

Planktopeptin BL1125 in anabaenopeptin B sta selektivno fitotoksična za fitoplanktonske organizme. Fitotoksičnost planktopeptina BL1125 in anabaenopeptina B se kaže v zmanjšani hitrosti delitev oz. celični lizi in povečani fluorescenci fotosinteznih pigmentov. Glavni vpliv na cianobakterije, v katere planktopeptin vstopa, je bil izražen v povečanju fluorescence fikocianinov, specifičnih pigmentov za cianobakterije. Za razliko od delovanja mikrocistinov, ti ciklični peptidi ne povzročajo združevanja cianobakterij.

Ugotovili smo, da imajo ciklični peptidi cianobakterij v vodnih okoljih večjo vlogo, kot so mislili doslej. Odkrivanje delovanja, vloge in pomena cikličnih peptidov je ključnega pomena za razumevanje nekaterih procesov v vodnih telesih, saj lahko te snovi, skupaj z drugimi kemijskimi, fizikalnimi in biološkimi dejavniki, znatno vplivajo na zmanjševanje biotske pestrosti.

## 6.2 SUMMARY

Cyanobacteria capable of bloom formation produce cyclic peptides on a large scale. In the aquatic environment many different phytoplankton organisms are exposed to these biologically active substances. The representatives of three different groups of cyclic peptides were chosen: microcystin as the representative of hepatotoxic cyclic peptides, planktopeptin BL1125 as the representative of depsipeptides and anabaenopeptin B as the representative of cyclic peptides possessing ureido bond. The impact of these cyclic peptides on morphology and physiology of some phytoplankton organisms were studied.

Intracellular concentrations of cyclic peptides are high in comparison to extracellular ones. When cyanobacterial cells are condensed in different forms of blooms, local concentrations of cyclic peptides rise and thus have more pronounced effect on surrounding organisms. *In vitro* experiments with cyclic peptides have shown characteristic impact on different phytoplankton species. Cyclic peptides induce morphological and physiological changes in cyanobacterial strains of *Microcystis* sp. as well as in the green alga *Scenedesmus quadricauda*, but not before the cells start dividing. The stress caused by cyanobacterial cyclic peptides on phytoplanktonic organisms differs from the stress caused by physical and/or chemical stress factors.

Microcystins induce a faster and better cell buoyancy regulation in water body as a consequence of cell aggregation, increased concentration of photosynthetic pigments and increased biovolume of cyanobacteria. This is a competitive advantage for cyanobacteria in comparison to other phytoplanktonic organisms. The role of microcystins within the producer cell differs from the role in the aqueous environment. Microcystins influence the light harvesting complex of phototrophs which can be interpreted as a signal announcing worsening of the light conditions due to the massive proliferation of cyanobacteria. Considering competition of microcystin producing and nonproducing cyanobacterial strains, the microcystin producing strain prevails even though the nonproducing one is not eliminated. Nonproducing cyanobacterial strain influence producing strain in a manner that producing strain produces more microcystins in comparison to production of the monoculture. Different cyanobacterial strains might be of advantage to each other. When blooming, biomass and biovolume of cyanobacterial cells might be more important for the domination than cell proliferation rate.

Planktopeptin BL1125 and anabaenopeptin B are selectively toxic for plankton organisms. Phytotoxicity of planktopeptin BL1125 and anabaenopeptin B is exhibited as decreased proliferation or cell lyses and increased fluorescence of photosynthetic pigments. The major impact on cyanobacteria, prone to planktopeptin entry, was seen as an increase in phycocyanin fluorescence, pigments specific to cyanobacteria. In contrast to microcystin, these cyclic peptides do not induce aggregation of cyanobacteria.

We have discovered that cyclic peptides of cyanobacteria in water environment have more important role than it was thought before. Discovery of function, role and importance of cyclic peptides is the key for understanding some of the processes in water environment. It is obvious that these substances, together with other chemical, physical and biological factors, have quite a large impact on decreased biodiversity.

## 7 VIRI

- Abe T., Lawson T., Weyers J.D.B., Codd G.A. 1996. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: Implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist*, 133: 651-658
- Adolph K.W., Haselkorn R. 1972. Photosynthesis and the development of blue-green algal virus N-1. *Virology*, 47, 2: 370-374
- Allen J.F. 1992. Protein phosphorylation in the regulation of photosynthesis. *Biochimica Biophysica Acta*, 1098: 275-335
- Allen M.M., Hutchison F. 1976. Effect of some environmental factors on cyanophage AS-1 development in *Anacystis nidulans*. *Archives of Microbiology*, 110, 1: 55-60
- Banker R., Carmeli S. 1999. Inhibitors of serine proteases from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis sp.* *Tetrahedron*, 55: 10835-10844
- Barco M., Flores C., Rivera J., Caixach J. 2004. Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. *Toxicon*, 44, 8: 881-886
- Batagelj E. 2000. Vpliv mikrocinov na fotosintetske pigmente pri cianobakteriji *Microcystis aeruginosa*. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 63 str.
- Berard A., Leboulandr C., Pelte T. 1999. Tolerance of *Oscillatoria limnetica* to atrazine in natural phytoplankton population and in pure culture: influence of season and temperature. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 37, 4: 472-479
- Bowling L. 1994. Occurrence and possible causes of severe cyanobacterial bloom in lake Cargelligo, New South Wales. *Australian Journal of Marine Freshwater Research*, 45: 737-745
- Bricelj M., Sedmak B. 2001. Transport of biologically active substances through gravel strata. V: *New approaches Characterizing Groundwater Flow*, Seiler & Wohnlich (ur.), Netherlands, Swets & Zeitlinger Lisse, 25-29.
- Bücher C., Zsíros O., Garab G. 1998. Alternative cyanide sensitive oxidase interacting with photosynthesis in *Synechocystis* PCC6803. *Photosynthetica*, 35, 2: 223-231
- Bucka H. 1989. Ecology of selected planctonic algae causing water blooms. *Acta Hydrobiologica*, 31: 207-258
- Burkholder J.M. 2002. Cyanobacteria. V: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Bitton G. (ur.), New York, Willey Publications: 952-982

- Campbell D., Hurry V., Clarke A.K., Gustafsson P., Öquist G. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 667-683
- Carmichael W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 445-459
- Carmichael W.W. 1994. The toxins of cyanobacteria, *Scientific American*, 270: 78-86
- Carmichael W.W., Falconer I.R. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins and control measures. V: Algal toxins in seafood and drinking waters. Falconer I.R. (ur.) London, Academic Press: 187 - 209
- Chong M.W.K., Gu K.D., Lam P.K.S. 2000. Study of the cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells. *Chemosphere*, 41, 1-2: 143-147
- Cohen P., Cohen P.T.W. 1989. Protein phosphatases come of age. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 21435-21438
- Cousins I.T., Bealing D.J., James H.A., Sutton A. 1996. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Water Research*, 30: 481-485
- Cowlishaw J., Morsa M. 1975. Coevolution of a virus-alga system. *Applied Microbiology*, 29, 2: 234-239
- Cseke C.S., Farkas G.L. 1979. Effects of light on the attachment of cyanophage AS-1 to *Anacystis nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 137, 1: 667-669
- Chorus I., Bartram J. (ur.) 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E& FN Spon, World Health Organization, Geneva
- Currier T.C., Wolk C.P. 1979. Characteristics of *Anabaena variabilis* influence plaque formation by cyanophage N-1. *Journal of Biology*, 139, 1: 88-92
- Dawson R.M. 1998. The toxicology of microcystins - review article. *Toxicon*, 36, 7: 953-962
- Dittmann E., Claussner Y., Ziemert N., Tandeau Marsac N., Börner T. Microcystin – an intracellular signal molecule. Abstract from sixth international conference on toxic cyanobacteria. Bergen, Norway 21-27 June, 2004.
- Dittmann E., Erhard M. 2001. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Microbiology-SGM*, 147: 3113-3119, Part 11
- Dittmann E., Neilan B.A., Erhard M., von Döhren H., Börner T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production

- in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Molecular Microbiology*, 26: 779-787
- Dragan I. 1998. Izolacija mikrocinov in njihov vpliv na fitoplankton v kulturi. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 55 str.
- Drakare S. 2002. Competition between picoplanktonic cyanobacteria and heterotrophic bacteria along crossed gradients of glucose and phosphate. *Microbial Ecology*, 44, 4: 327-335
- Dunny G.M., Winans S.C. 1999. Cell-cell signaling in bacteria, *American Society of Microbiology*, Washington, D. C.: 1-5
- Dunphy G.C., Miyamoto C., Maigen E. 1997. A homoserine lactone autoinducer regulates virulence of an insect-pathogenic bacterium. *Journal of Bacteriology*, 197: 5288 – 5291
- Dworkin M. 1991 Increases in the intracellular concentration of glycerol during the development in *Myxococcus xanthus* S-COURTNEY-FRASCH. *FEMS Microbiology Letters*, 120, 3: 369-373
- Edwards C. 2000. Problems posed by natural environments for monitoring microorganisms. *Molecular Biotechnology*, 15, 3: 211-223
- Eggersdorfer B., Häder D.P. 1991. Phototaxis, gravitaxis and vertical migrations in the marine dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *FEMS Microbiology Letters*, 85, 4: 319-326
- Eleršek T. 2001. Mikrocin-LR in vsebnost klorofila pri algi *Scenedesmus quadricauda* (Breb.), *Diplomsko delo*, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni študij mikrobiologije, 48 str.
- Eullaffroy P., Vernet G. 2003. The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a possible tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity. *Water Research*, 37: 1983-1990
- EUROHAB Science Initiative – Harmful algal blooms in European marine and brackish waters, 1998, Report of an international workshop organised jointly by the MAST Programme of European Commission, DG XII, NUTEK (Swedish national board for industrial and technical development) and the University of Kalmar, Department of Marine Sciences. Kalmar, Sweden November 5-7, str. 39-44
- Falconer I.R. 1994. Toxicity of the blue-green algae (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assesment. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9: 131-139
- Falconer I.R. 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology*, 14, 1: 5-12



- Fargasova A. 1998. Comparison of tributyltin compound effects on alga *Scenedesmus quadricauda* and the benthic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41, 3: 222-230
- Fargasova A. 1999. The green alga *Scenedesmus quadricauda* – A subject for the study of inhibitory effects of Cd, Cu, Zn, Pb and Fe. *Biologia (Bratislava)*, 54, 3: 303-308
- Feitz A.J., Waite T.D. 1999. Photocatalytic degradation of the blue-green algal toxin microcystin-LR in a natural organic-aqueous matrix. *Environmental Scientific Technology*, 33, 2: 243-249
- Fischer W.J., Dietrich D.R. 2000. Toxicity of the cyanobacterial cyclic heptapeptide toxins microcystin-LR and -RR in early life stages of the African frog. *Aquatic Toxicology (Amsterdam)*, 49, 3: 189-198
- Flynn K.J., Fasham M.J. 2002. A modeling exploration of vertical migration by phytoplankton. *Journal of Theoretical Biology*, 218, 4: 471-484
- Fong P., Zedler J.B. 1993. Temperature and light effects on the seasonal succession of algal communities in shallow coastal lagoons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 171, 2: 259-272
- Frangež R., Kosec M., Sedmak B., Beravs K., Demsar F., Juntos P., Pogačnik M., Šuput D. 2000. Subchronic liver injuries caused by microcystins. *European Journal of Physiology*, 440: R103-R104
- Frangež R., Žužek M., Mrkun J., Šuput D., Sedmak B., Kosec M. 2003. Microcystin-LR affects cytoskeleton and morphology of rabbit primary whole embryo cultured cells in vitro. *Toxicol*, 41: 999-1005
- Fuqua C., Parsek M.R., Greenberg E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing, *Annual Review of Genetics*, 35: 439-468
- Gardner W.D., Walsh I.D., Richardson M.Y. 1993. Biophysical forcing of particle production and distribution during a spring bloom in the North Atlantic. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 40, 1-2: 171-195
- Geider R.J., Anning T. 1998. Is there more than one photoacclimation strategy in phytoplankton? V: Winter meeting 1998, London, 5-8 jan. 1998. *British Physiological Society*  
<http://www.quab.ac.uk/bb/jbpage/bpshome/abs98.htm> (12 jan. 2001)
- Geider R.J., Osborne B. A. 1992. *Algal photosynthesis*. London, Chapman & Hall, 625 str.
- Giardi M.T., Cona A., Geiken B. 1995. Photosystem II core phosphorylation heterogeneity and the regulation of electron transfer in higher plants: a review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38: 67-75

- Gkelis S., Harjunpää V., Lanaras T., Sivonen K. 2005. Diversity of hepatotoxic microcystins and bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters. *Environmental Toxicology*, 20, 3: 249-256
- Gliwicz Z.M. 1990. Why do cladocerans fail to control algal blooms? *Hydrobiologia*, 200/201: 83-97
- Goldberg J. B. 2000. Peek a boo, I sense you. *Trends in Microbiology*, 8, 7: 307
- Grach-Pogrebinsky O., Sedmak B., Carmeli S. 2003. Protease inhibitors from a Slovenian Lake Bled toxic waterbloom of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Tetrahedron*, 59: 8329-8336
- Grach-Pogrebinsky O., Sedmak B., Carmeli S. 2004. Seco[D-Asp<sup>3</sup>] microcystin-RR and [D-Asp<sup>3</sup>, D-Glu(OMe)<sup>6</sup>] microcystin-RR, two new microcystins from a toxic water bloom of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Journal of Natural Products*, 67: 337-342
- Gross E.M., Meyer H., Schilling G. 1996. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. *Phytochemistry*, 41, 1: 133-138
- Grover J.P. 2002. Stoichiometry, herbivory and competition for nutrients: simple models based on planktonic ecosystems. *Journal of Theoretical Biology*, 214, 4: 599-618
- Hagmann L., Jüttner F. 1996. Fischerellin A, a novel photosystem-II-inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity. *Tetrahedron Letters*, 37: 6539-6542.
- Hammer Ř., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 1: 1-9
- Haney J.F. 1987. Field studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zealand Journal of Marine Freshwater Research*, 21: 467-475
- Harada K., Mayumi T., Shimada T., Suzuki M., Kondo F., Watanabe M.F. 1993. Occurrence of four depsipeptides, aeruginopeptins, together with microcystins from toxic cyanobacteria. *Tetrahedron Letters*, 34: 6091-6094
- Harada K.I., Fujii K., Shimada T., Suzuki M., Sano H., Adachi K., Carmichael W.W. 1995. The cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aque* NRC 525-17. *Tetrahedron Letters*, 36, 9: 1511-1514
- Harper D. 1992. *Eutrophication of freshwaters*. First edition. London, Chapman & Hall: 326 str.
- Herzig R., Dubinsky Z. 1992. Photoacclimation, photosynthesis and growth in phytoplankton. *Israel Journal of Botany*, 41, 4-6: 199-212

- Hesse K., Dittmann E., Börner T. 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiology Ecology*: 39-43
- Hondzo M., Lyn D. 1999. Quantified small-scale turbulence inhibits the growth of a green alga. *Freshwater Biology*, 41, 1: 51-61
- Horda K., Tsuji K. 1998. Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environment. *Toxin Reviews*, 17, 3: 385-403
- Http 1: <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/BOT311/Cyanobacteria> (1.12.2005)
- Hu Z., Liu Y., Li D. 2004. Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Environmental Toxicology*, 19, 6: 571-577
- Ibelings B.W., Mur L.R. 1992. Microprofiles of photosynthesis and oxygen concentration in *Microcystis* sp. scum. *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 3: 195-203
- Ishida K., Murakami M., Matsuda H., Yamaguchi K. 1995. Micropeptin 90, a plasmin and trypsin inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-90). *Tetrahedron Letters*, 36, 20: 3535-3538
- Ishii H., Abe T. 2000. Release and biodegradation of microcystins in blue-green algae. *Journal of the School of Marine Science and Technology of Tokai University*, 49: 143-157
- Itou Y., Suzuki S., Ishida K., Murakami M. 1999. Anabaenopeptins G and H, potent carboxypeptidase A inhibitors from the cyanobacterium. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 9: 1243-1246
- Jones G.J., Falconer I.R., Wilkins R.M. 1995. Persistence of cyclic peptide toxins in dried *Microcystis aeruginosa* crust from lake Mokoan, Australia. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10: 19-24
- Jungmann D., Ludwichowski K-U., Faltin V., Benndorf J. 1996. A field study to investigate environmental factors that could effect microcystin synthesis of a *Microcystis* population in the Bautzen reservoir. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 81: 493-501
- Kaftan D., Meszaros T., Whitmarsh J. 1999. Characterization of photosystem II activity and heterogeneity during the cell cycle of the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Plant Physiology* (Rockville), 120, 2: 433-441
- Kato T., Watanabe M.F., Watanabe M. 1991. Alloenzyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic and phylogenetic inference. In: Hickel, B., Anagnostidis, K., Komarek, J., (ur.), Proc.11<sup>th</sup> Symp. of IAC, Plon, FRG, 1989, Cyanophyta/Cyanobacteria-Morphology, Taxonomy, Ecology, Archiv fuer Hydrobiologie Supplementband, 64: 129-140

- Keating K. I. 1977, Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake, *Science*, 196, 4292: 885-887
- Kobayashi J., Sato M., Ishibashi M., Shigemori H., Nakumara T., Ohizumi Y. 1991a. Keramide A, a novel peptide from the okinawan marine sponge *Theonella* sp.. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* 2609
- Kobayashi J., Sato M., Murayama T., Ishibashi M., Wälchi M.R., Kanai M., Shoji J. 1991b. Konbamide, a novel peptide with calmodulin antagonistic activity from the okinawan marine sponge *Theonella* sp. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* 1050
- Kolber Z., Wyman K.D., Falkowski P.G. 1990. Natural variability in photosynthetic energy conversion efficiency: A field study in the Gulf of Maine. *Limnology and Oceanography*, 35: 72-79
- Kosi G. 1999. Pojavljanje toksičnih cianobakterij v slovenskih površinskih vodah. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 114 str.
- Kotak B.G., Kenefick S.L., Fritz D.L., Rousseaux C.G., Prepas E.E., Hruday S.E. 1993. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Water Research*, 27: 495-506
- Kubo T., Hosoya K., Watabe Y., Tanaka N., Sano T., Kaya K. 2004. Recognition of hepatotoxic homologues of microcystin using a combination of selective adsorption media. *Journal of Separation Science*, 27, 4: 316-324
- Kuepper H., Kuepper F. 1998. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research*, 58, 2: 123-133
- Kurmayer R., Dittmann E., Fastner J., Chorus I. 2002. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology*, 43: 107-118
- Kuwata A., Miyazaki T. 2000. Effects of ammonium supply rates on competition between *Microcystis novaeckii* (Cyanobacteria) and *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta): simulation study. *Ecological Modeling*, 135: 81-87
- Lankoff A., Krzowski Ł., Głab J., Banasik A., Lisowka H., Kuszewski T., Gózdź S., Wójcik A. 2004. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. *Mutation Research*, 559: 131-142
- Lazar D. 1999. Review. Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochimica Biophysica Acta*, 1421: 1-28
- Lee T.H., Chen Y.M., Chou H.N. 1998. First report of microcystins in Taiwan. *Toxicon*, 36, 2: 247-255

- Lee, T., Tsuzuki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, K., Karube, I., 1994. *In vivo* fluorimetric method for early detection of cyanobacterial waterblooms. *Journal of Applied Phycology*, 6, 489-495
- Lin C.G. 1972. Phytoplankton successions in an eutrophic lake with special reference to blue-green algal blooms. *Hydrobiologia*, 39: 321-334
- Long B.M., Jones G.J., Orr P.T. 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1: 278-283
- Lucas W.J., Berry J.A. 1985. Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms. *Physiologia Plantarum*, 65: 539-543
- Lukač M., Aegerter R. 1992. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 31, 3: 293-305
- Lukin V.B. 2003. Mechanisms responsible for the development of periphyton community structure during seasonal succession: the role of interspecies competition and plankton sedimentation. *Zhurnal Obshchei Biologii*, 64, 3: 263-272
- MacKintosh C., Beattie K.A., Klumpp S., Cohen P., Codd G.A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammalian and higher plants. *FEBS* 264: 187-192
- Malbrouck C., Trausch G., Devos P., Kestemont P. 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 135: 39-48
- Marahiel M.A., Stachelhaus T., Mootz H.D. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews*, 97: 2651-2673
- Martin C., Oberer L., Ino T., König W.A., Busch M., Weckesser J. 1993. Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. PCC 7806. *The Journal of Antibiotics*, 46: 1550-1556
- Masojidek J., Torzillo G. 1999. Photoadaptation of two members of *Chlorophyta* in laboratory and outdoor cultures: Changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. *Planta (Berlin)*, 209, 1: 126-135
- Matern U., Oberer L., Erhard M., Herdman M., Weckesser J. 2003. Hofmannolin, a cyanopeptolin from *Scytonema hofmanni* PCC 7110. *Phytochemistry*, 64: 1061-1064
- Matern U., Oberer L., Falchetto A.R., Erhard M., König W.A., Herdman M., Weckesser J. 2001. Scyptolin A and B, cyclic depsipeptides from axenic cultures of *Scytonema hofmanni* PCC 7110. *Phytochemistry*, 58: 1087-1095
- McDonough M.A., Schofield C. 2003. New structural insights into the inhibition of serine proteases by cyclic peptides from bacteria. *Chemistry & Biology*, 10: 898-900

- Mellgren G., Vintermyr O.K., Doskeland S.O. 1995. Okadaic acid, cAMP, and selected nutrients inhibit hepatocyte proliferation at different stages in G1: modulation of the cAMP effect by phosphatase inhibitors and nutrients. *Journal of Cell Physiology*, 136, 2: 232-240
- Meszaros T., Kaftan D. 1998. Functional and structural heterogeneity of PS II during the cell cycle of the green alga *Scenedesmus quadricauda*. V: ICP'98 Budapest abstracts, 1998  
<http://www.alga.cz/icp98abs.htm> (12 jan. 2001)
- Miller M. B., Bassler B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review Of Microbiology*, 55: 165-199
- Milutinović A., Živin M., Zorc-Pleskovič R., Sedmak B., Šuput D. 2003. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins-LR and -YR. *Toxicon*, 42: 281-288
- Moisa I., Sotropa E., Velehorsch V. 1981. Sequence of morphology alternations in blue-green algae in the course of cyanophage infection. *Virologie*, 32, 2: 133-137
- Morris R.J. 2000. The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. *Toxicon*, 38: 303-308
- Mukhopadhyay A., Chattopdhyay J., Tapaswi P.K. 1998. A delay differential equations model of plankton allelopathy. *Mathematical Bioscience*, 149: 167-189
- Mur L.R. 1998. Some aspects of the ecophysiology cyanobacteria. *Anales de Microbiologie*, 134B, 1: 61-72
- Mur L.R., Gons H.J., Liere L.V. 1977. Some experiments on the competition between green algae and blue-green bacteria in light-limited environments. *FEMS Microbiology Letters*, 1, 6: 335-338
- Mur L.R., Gons H.J., Liere L.V. 1978. Competition of the green alga *Scenedesmus* and the blue-green alga *Oscillatoria*. *Mittlungen Internationale Vereinigung Limnologie*, 21: 473-479
- Mur L.R., Schreurs H. 1995. Light as a selective factor in the distribution of phytoplankton species. *Water Science and Technology*, 32, 4: 25-34
- Murakami M., Shin J.S., Matsuda H., Ishida K., Yamaguchi K. 1997. A Cyclic Peptide, Anabaenopeptin B, from the Cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Phytochemistry*, 444, 3: 449-452
- Nakai S., Inoue Y., Hosomi M., Murakami A. 1999. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Water Science and Technology*, 39, 8: 47-53
- Namikoshi M., Rinehart K.L. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 373-384

- Navratil S. 1998. The effects of pure microcystin-LR and biomass of blue-green algae on blood indices of carp. *Acta Veterinaria (Brno)*, 67, 4: 273-279
- Nedbal L., Meszaros T., Kaftan D. 1998. Photoinhibition in a synchronized culture of green alga *Scenedesmus quadricauda*. V: ICP'98 Budapest abstracts, 1998 <http://www.alga.cz/icp98abs.htm> (12 jan. 2001)
- Newhook R., Briard F. 1987. Bacteria as structuring agents in lakes – field manipulations with bacterioplankton. *Archiv Für Hydrobiologie*, 109, 1: 121-138
- Oehlke J., Beyermann M., Wiesner B., Melzig M., Berger H., Krause E., Bienert M. 1997. Evidence for extensive and non-specific translocation of oligopeptides across plasma membranes of mammalian cells. *Biochimica Biophysica Acta*, 1330: 50-60
- Oettmeier W., Soll H.J. 1983. Competition between plastoquinone and 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea at the acceptor side of Photosystem II. *Biochimica Biophysica Acta*, 724: 287-290
- Okano T., Sano T., Kaya K. 1999. Micropeptin T-20, A novel phosphate-containing cyclic depsipeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Letters*, 40: 2379-1382
- Okino T., Murakami M., Haraguchi R., Munekata H., Matsuda H. and Yamaguchi K. 1993. Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Letters*, 34: 8131–8134
- Orr P.T., Jones J.J. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnological Oceanography*, 43, 7: 1604-1614
- Papageorgiou G.C. 1996. The photosynthesis of cyanobacteria (blue bacteria) from the perspective of signal analysis of chlorophyll *a* fluorescence. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55: 596-617
- Park H.D., Iwami C., Watanabe M.F., Harada K-I., Okino T., Hayashi H. 1998. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environmental Toxicology and Water Quality*, 13: 61-72
- Pearl H. W. 1988. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria). V: Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton Sandgren, C. D.(ur.), Cambridge. Cambridge University Press, 261-315
- Pearl H.W. 1996. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycology*, 35, 6: 25-35
- Pearson L.A., Hisbergues M., Börner T., Dittmann E., Neilan B.A. 2004. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the

- cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Applied and Environmental Microbiology, 70, 11: 6370-6378
- Pickett-Heaps J.D. 1975. Green algae-structure, reproduction and evolution in selected genera. First edition. Massachusetts (USA), Sinauer Associates, Publishers Sunderland: 616 str.
- Price G.D., Sultemeyer D., Klughammer B., Ludwig M., Badger M.R. 1998. The functioning of the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in several cyanobacterial strains. Canadian Journal of Botany, 76, 6: 973-1002
- Rantala A., Fewer D., Hisbergues M., Rouhiainen L., Vaitomaa J., Börner T., Sivonen K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. PNAS – Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 101, 2: 568-573
- Raps S., Kycia H., Ledbetter M.C., Siegelman H.W. 1985. Light intensity adaptation and phycobilisome composition of *Microcystis aeruginosa*. Plant Physiology, 79: 983-987
- Raps S., Wyman K., Siegelman H.W., Falkowski P.G. 1983. Adaptation of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to light intensity. Plant Physiology, 72: 829-832
- Reshef V., Carmeli S. 2001. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Tetrahedron, 57: 2885-2894
- Reynolds C.S. 1975. Interrelations of photosynthetic behaviour and buoyancy regulation in a natural population of a blue-green alga. Freshwater Biology, 5: 323-338
- Reynolds C.S. 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge University press, 394 str.
- Reynolds C.S. 1997. Vegetation processes in the pelagic: A model for ecosystem theory, Germany, Ecology institute, 371 str.
- Reynolds C.S. 1998. The control and management of cyanobacterial blooms. Special Publication of Australian Society of Limnologists, 12: 6-22
- Rieman B., Ernst D. 1982. Extraction of chlorophylls *a* and *b* from phytoplankton using standard extraction techniques. Freshwater Biology, 12: 217-223
- Riznichenko G., Lebedeva G. 1996. Fluorescence induction curves registered from individual microalga cenobiums in the process of population growth, Photosynthesis Research, 49: 151-157
- Rojickova P.R., Marsalek B. 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. Chemosphere, 38, 14: 3329-3338



- Schagerl M., Unterrieder I., Angeler D.G., 2002. Allelopathy among Cyanoprokariota and other algae originating from lake Neusiedlersee (Austria). *International Review of Hydrobiology*, 87, 4: 365-374
- Schatz D., Keren Y., Hadas O., Carmeli S., Sukenik A., Kaplan A. 2005. Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains. *Environmental Microbiology*, 7, 6: 798
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. 1995. Ecophysiology of green algae. V: *Ecophysiology of photosynthesis*. Schulze E. D., Caldwell M. M. (ur.). Berlin, Springer Verlag: 49-70
- Schubert H., Matthijs H.C.P., Mur L.R., Schiewer U. 1995. Blooming of Cyanobacteria in turbulent water with steep light gradients: the effect of intermittent light and dark periods on the oxygen evolution capacity of *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEMS Microbiology Ecology*, 18: 237-245
- Sedmak B. 1994. Biotoksini v sladkih vodah in morju ter njihov vpliv na človeka in okolje. *Fazno poročilo*. Ljubljana, Nacionalni Inštitut za biologijo: 1-11
- Sedmak B., Eleršek T. 2005. Microcystins Induce Morphological and Physiological Changes in Selected Representative Phytoplanktons. *Microbial Ecology*, 0: 1-8
- Sedmak B., Kosi G. 1997 a. Microcystins in Slovene freshwaters (Central Europe) – first report. *Natural toxins*, 5: 64-73
- Sedmak B., Kosi G. 1997 b. Cvetenje cianobakterij v ribnikih Republike Slovenije in njihova toksičnost. *Ichthyos*, 14, 1: 9-22
- Sedmak B., Kosi G. 1998. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *Journal of Plankton Research*, 20, 4: 691-708
- Sedmak B., Kosi G. 1998. Erratum. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *Journal of Plankton Research*, 20, 4: 1421
- Sedmak B., Kosi G. 2002. Harmful cyanobacterial blooms in Slovenia – Bloom types and microcystin producers. *Acta Biologica Slovenica*, 45: 17-30
- Sedmak B., Kosi G., Kolar B. 1994. Cyanobacteria and their relevance. *Periodicum Biologorum*, 96, 4: 428-430
- Sedmak B., Šuput D. 2002. Co-operative effects in tumorigenicity. The microcystin example. *Radiology and Oncology*, 36, 2: 162-164
- Shapiro J. 1990. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for importance of CO<sub>2</sub> and pH. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 24: 38-54

- Shi L., Carmichael W.W., Kennely P.J. 1999. Cyanobacterial PP family protein phosphatases possess multifunctional capabilities and are resistant to microcystin-LR. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 15: 10039-10046
- Shi L., Carmichael W.W., Miller I.M. 1995. Imuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Archives of Microbiology*, 163: 7-15
- Singh D., Tyagi M.B. Kumar A., Thakur J.K., Kumar A. 2001. Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17: 15-22
- Sivonen K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2658-2666
- Sklenar K.S., Horne A.J. 1999. Effect of the cyanobacterial metabolite geosmin on growth of a green alga. *Water Science and Technology*, 40, 6: 225-228
- Smayda T.J., Boleyn B.J. 1965. Experimental observations on the flotation of marine diatoms. I. *Thalassiosira* cf. *nana*, *Thalassiosira rotula* and *Nitzschia seriata*. *Limnology and Oceanography*, 10: 499-509
- Smith G.D., Doan N.T. 1999. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. *Journal of Applied Phycology*, 11: 337-344
- Snel J.F.H., Vos J.H., Gylstra R., Brock T.C.M. 1998. Inhibition of photosystem II (PSII) electron transport as a convenient endpoint to assess stress of the herbicide linuron on freshwater plants. *Aquatic Ecology*, 32: 113-123
- Stevenson C.S., Capper E.A, Roshak A.K., Marquez B., Grace K., Gerwick W.H, Jacobs R.S. 2002. Scytonemin - a marine natural product inhibitor of kinases key in hyperproliferative inflammatory diseases. *Inflammation Research*, 51, 2: 112-114
- Sukenik A., Eshkol R., Livne A., Hadas O., Kaplan A., Tcernov D., Vardi A., Rom M., 2002. Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): a novel allelopathic mechanism. *Limnology and Oceanography*, 47: 1656-1663
- Swift S, Downie JA, Whitehead NA, Barnard AML, Salmond GPC, Williams P. 2001. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Advances In Microbial Physiology*, 45: 199-270
- Šuput D., Milutinovič A., Serša I., Sedmak B. 2002. Chronic exposure to cyanobacterial lyophilisate reveals stronger effects than exposure to purified microcystins – a MRI study. *Radiology and Oncology*, 36, 2: 165-167

- Thompson A.S., Rhodes J. C., Pettman I. 1988. Culture Collection of algae and Protozoa – Catalogue of Strains, 5<sup>th</sup> Ed, Natural Environment Research Council, United Kingdom, Kendal, Ambleside, Titus Wilson and Son Ltd., str. 22
- Tomasz P., Krajewska B., Zabel M. 1965. Ultraimmunocytochemical analysis of pancreatic islet hormones. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 37, 2: 71-72
- Tsuchiya Y., Watanabe M. 1997. Disk type solid-phase extraction of microcystin in environmental water. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43: 190-196
- Tsuji K., Nalto S., Kondo F., Ishikawa N., Watanabe M.F., Suzuki M., Harada K.I. 1994. Stability of microcystins from Cyanobacteria: Effect of Light on Decomposition and Isomerisation. *Environmental Science and Technology*, 28: 173-177
- Tsuji K., Setsuda S., Watanuki T., Kondo F., Nakazawa H., Suzuki M., Harada K-I. 1996. Microcystin levels during 1992 – 1995 for lakes Sagami and Tsukui – Japan. *Natural Toxins*, 4: 189–194
- Tsuji K., Watanuki T., Kondo F., Watanabe M.F., Suzuki S., Nakazawa H., Suzuki M., Uchida H., Harada K.I. 1995. Stability of microcystins from cyanobacteria. II. Effect of UV light on decomposition and isomerisation. *Toxicon*, 33: 1619-1631
- Tsukamoto S., Painuly P., Young K.A., Yang X., Shimizu Y., Cornell L. 1993. Microcystilide A: a novel cell-differentiation-promoting depsipeptide from *Microcystis aeruginosa* NO-15-1840. *Journal of American Chemical Society*, 115, 23: 11046–11047
- Tukaj Z., Bohdanowicz J., Aksmann A. 1998. A morphometric and stereological analysis of ultrastructural changes in two *Scenedesmus* strains subjected to diesel fuel oil pollution. *Phycologia*, 37, 5: 388-393
- Ueno Y., Nagata S., Tsutsumi T., Hasegawa A., Yoshida K., Suttajit M., Mebs D., Pütsch M., Vasconcelos V. 1996. Survey of microcystins in environmental water by a high sensitive immunoassay based on monoclonal antibody. *Natural Toxins*, 4: 271-276
- Utkilen H., Gjølme N. 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Applied Environmental Microbiology*, 58: 1321-1325
- Vajcova V., Navratil S., Palikova M. 1998. The effect of intraperitoneally applied pure microcystin-LR on haematological, biochemical and morphological indices of silver carp. *Acta Veterinaria (Brno)*, 67, 4: 281-287
- Van den Hoek C., Mann D.G., Jahns H.M. 1995. *Algae - an introduction to phycology*. Cambridge, Cambridge university press: 300-312

- Vardi A., Schatz D., Beeri K., Motro U., Sukenik A., Levine A., Kaplan A. 2002. Dinoflagellate-Cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake. *Current Biology*, 12: 1767-1772
- Varela R.A., Cruzado A, Tintore J. 1994. A simulation analysis of various biological and physical factors influencing the deep-chlorophyll maximum structure in oligotrophic areas. *Journal of Marine Systems*, 5: 143-157
- Vasconcelos V.M. 1999. Cyanobacterial toxin in Portugal: Effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 3: 249-254
- Via-Ordorika L., Fastner J., Kurmayer R., Hisbergues M., Dittmann E., Komarek J., Erhard M., Chorus I. 2004. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: Detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 592-602
- Voet D., Voet J.G. 1995. *Biochemistry*. Second edition. New York, John Wiley & Sons: 626-642
- Vollenweider R.A. 1974. Primary production in aquatic environments. *Internal Biology Program Handbook 12*. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 225 str.
- Vollenweider, R.A., 1969. Primary Production in Aquatic Environments. *Internal biology Program Handbook 12*, Blackwell Scientific Publications Oxford, Burgess and Son, Great Britain, pp.213
- von Döhren H., Keller U., Vater J., Zoicher R. 1997. Multifunctional peptide synthases. *Chemical Reviews*, 97: 2675-2705
- Vrhovšek D., Kosi G. 1983. Ocena onesnaženosti Save od izvira do Ljubljane s pomočjo perifitona, *Biološki vestnik*, 31, 2: 103-118
- Walsby A. E. 1994. Gas vesicles. *Microbiology Reviews*, 58: 94-144
- Watanabe M.F., Tsuji K., Watanabe J., Harada K., Suzuki M. 1992. Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*. *Natural Toxins*, 1: 48-53
- Watanabe M.F., Watanabe M., Kato T., Harada K-I., Suzuki M. 1991. Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (blue-green algae, cyanobacteria). *Botanical Magazine Tokyo*, 104: 49-57
- Webster 1983. *Webster's ninth new collegiate dictionary*. Merriam-Webster, Inc., Springfield, Mass

- Welker M., Christiansen G., von Döhren H. 2004. Diversity of coexisting *Planktothrix* (cyanobacteria) chemotypes deduced by mass spectral analysis of microcystins and other oligopeptides. *Archives of Microbiology*, 182: 288-298
- Wetzel R.G. 1975. *Limnology*, W. B. Saunders Company, Library of congress Cataloging in Publication Data, 860 str.
- Wetzel R.G., Likens G.E. 1995. Composition and biomass of phytoplankton. V: *Limnological Analyses*, 2<sup>nd</sup> Edition, New York, Springer-Verlag, 139-165
- Whittles K., Goldie A. (Ur.) 1993. *Concise Dictionary of Biology*. Tiger Books International PLC, London
- WHO, 1998. Guidelines for drinking-water quality, 2<sup>nd</sup> ed. Health criteria and other supporting information. World Health Organisation, Geneva.
- WHO, 2003. Algae and cyanobacteria in fresh water (Chapter 8: 136-158) V: Guidelines for safe recreational water environments, Vol. 1, Coastal and fresh waters. World Health Organisation, Geneva
- Yamazaki H., Kamykowski D. 1991. The vertical trajectories of motile phytoplankton in a wind-mixed water column. *Deep sea research, Part A: Oceanographic Research Papers*, 38, 2: 219-241
- Yan F., Ozsoz M., Sadik O. A. 2000. Electrochemical and conformational studies of microcystin-LR. *Acta Analytica Chemica*, 409, 1-2: 247-255
- Young F.M., Thomson C., Metcalf J.S., Lucocq J.M., Codd G.A. 2005. Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *Journal of Structural Biology*, 151: 208-214
- Zambrano F., Canelo E. 1996. Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> pump of the gill of carp (*Cyprinus linneo*). *Toxicon*, 34, 4: 451-458
- Zavilgelski G. B., Manukhov. 2001. »Quorum sensing« or how bacteria »talk« to each other. *Molekuliarnaia Biologiia*, 35, 2: 268-277
- Zhon J., Fritz L. 1994. Okadaic acid antibody localizes to chloroplasts in the DSP-toxin producing dinoflagellats. *Phycologia*, 33, 1: 232-229
- Žegura B., Sedmak B., Filipič M. 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*, 41: 41-48

## **ZAHVALA**

Rada bi se zahvalila svojemu mentorju Bojanu Sedmaku za posredovano znanje, ideje in kritične pripombe, tehnični sodelavki Karmen Stanič za pomoč, sodelavcem Gorazdu Kosiju in Mihaelu Briclju za dobro delovno vzdušje v laboratoriju ter vsem ostalim, ki jih na tem mestu ne bom omenila z imenom in priimkom, a so mi pri tem delu pomagali in me vzpodbujali do konca.